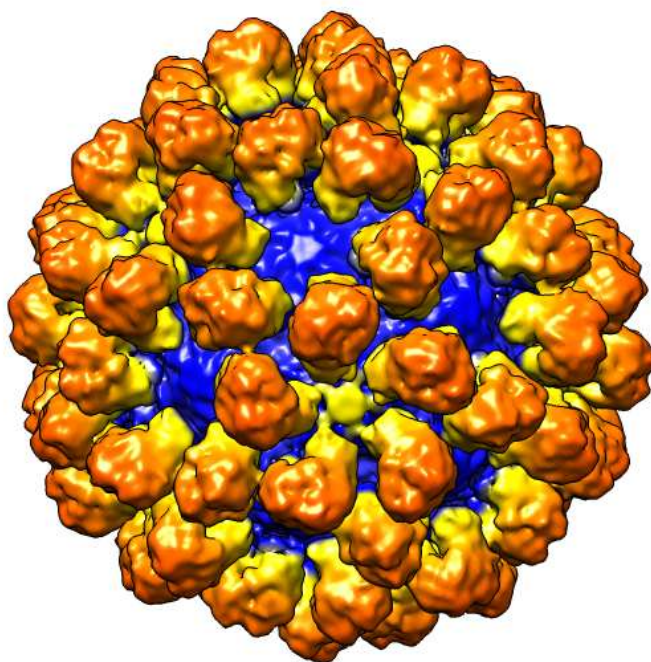


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias**

**Cápsidas vacías del virus de la enfermedad hemorrágica
del conejo como plataforma para la inducción de
respuesta humoral neutralizante y protectora frente a
epítopos B heterólogos**



-TESIS DOCTORAL-

**Noelia Moreno Mogedano
Madrid, 2016**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular



**Cápsidas vacías del virus de la enfermedad hemorrágica
del conejo como plataforma para la inducción de
respuesta humoral neutralizante y protectora frente a
epítomos B heterólogos**

Memoria presentada por **Noelia Moreno Mogedano**,
Licenciada en Veterinaria, para optar al grado de
Doctora en Ciencias Biológicas.

Universidad Autónoma de Madrid,
Madrid, 2016

Tesis dirigida por los Doctores
Esther Blanco Lavilla y Juan Bárcena del Riego

CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE SANIDAD ANIMAL (CISA-INIA)



Los Doctores Juan Bárcenadel Riego y Esther Blanco Lavilla certifican que el trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el Centro de Investigación de Sanidad Animal (CISA-INIA) bajo su dirección.

La financiación corrió a cargo de una beca del Ministerio de Economía y Competitividad dentro del programa de Formación de Personal Investigador (FPI).



Fdo: Juan Bárcena del Riego



Fdo: Esther Blanco Lavilla

AGRADECIMIENTOS

Imposible empezar cualquier tipo de agradecimiento sin nombrar en primer lugar a mis directores de tesis, Esther Blanco y Juan Bárcena. Ellos me han dado la oportunidad de llevarla a cabo, una oportunidad que está formada en su totalidad por otras miles de pequeñas oportunidades. Sin la posibilidad de extenderme mucho más, permitidme que resuma todo lo que debería decirles en un gracias, muchas gracias.

En segundo lugar, no puedo dejar de reconocer la generosa comprensión de mi tutor de tesis, Iván Ventoso.

Pero hay otros muchos que, de forma desinteresada y siempre amable, han puesto su grano, o sus muchos granos de arena, desde otros centros de investigación para que este trabajo pudiese resultar más fácil mientras llegaba a puerto; entre ellos se encuentran José R. Castón, Amelia Nieto, David Andreu y gran parte de los miembros de sus equipos. Referencia esencial cabe hacer aquí hacia el Dr. Adolfo García-Sastre y su grupo, quienes me permitieron sacar el máximo provecho al sinfín de recursos, tanto materiales como humanos, que pusieron a mi disposición durante mi permanencia en el Icahn School of Medicine at Mount Sinai de Nueva York.

Y, por supuesto, a todos aquellos que en el CISA, que de algún modo u otro a lo largo de todo este tiempo me han echado esa mano que siempre aparece cuando más se necesita, entre ellos especialmente a Alí Alejo, por ese último empujón tan certero. Y aquí, en el CISA, es donde estoy en la obligación de hacer la mayor parada dentro de todos estos agradecimientos. Bea y Yoli son mis compañeras de laboratorio, pero esa denominación no les hace ningún tipo de justicia. Podría huir de tópicos, aunque no se me ocurriría mejor forma de explicarlo; ellas han sido mis compañeras, sí, pero además mi maestras, mis manos y mis pies (literalmente) y mi cabeza casi en cada momento. Me han ofrecido durante todo este tiempo un hombro en el que llorar, pero su verdadero mérito reside en que han conseguido que, más que para llorar, lo haya utilizado para apoyarme en él cada vez que no podía sostenerme por lo mucho que me han hecho reír. Agradecer eso en palabras es imposible. Sin ellas, simplemente, esta tesis no existiría.

Y fuera de las paredes de los laboratorios quedan los que se suelen considerar los personajes secundarios en el proceso de creación de las tesis. Pero esos personajes entre bambalinas son muchas veces tanto o más importantes que los protagonistas. Gracias a mis padres; estoy segura que nunca imaginaron que terminarían viéndome por este camino llamado investigación que a tantos les resulta ajeno. Pero una vez en él, me han acompañado como si fuese el suyo propio.

Gracias a mi hermana, Vanesa, y a David, porque han hecho una realidad del dicho que afirma que la familia está para lo que se la necesita, por apoyarme sin peros y aguantarme con infinita paciencia. Pero sobre todo a Carlota y a Olivia por comprender, sin llegar a comprender, que había por ahí unos ratoncitos y un montón de papeles que tantas horas de juego y mimos con su tía les han robado.

A ellas, a mis sobrinas, va dedicada esta tesis.

ABREVIATURAS.

aa:	aminoácido
crioME:	criomicroscopía electrónica
CPA:	célula presentadora de antígeno
CRFK:	Crandell Rees feline kidney (línea celular de riñón de gato)
CSA:	célula secretora de anticuerpos
DL₅₀:	dosis letal 50%
DIVA:	vacunas marcadas (<i>Differentiating infected from vaccinated animals</i>)
ELISPOT:	ensayo de puntos por inmunoabsorción ligado a enzima (<i>Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay</i>)
EMEM:	medio esencial mínimo de Eagle
FA:	fiebre aftosa
FCV:	calicivirus felino
H5:	High-Five (línea celular derivada de larvas de <i>Trichoplusia ni</i>)
h.p.i.:	horas postinfección
kb:	kilobase
LB:	Luria-Bertani (medio líquido para bacterias)
MDCK:	Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells (línea celular de epitelino renal canino)
MHC:	complejo principal de histocompatibilidad
NK:	células <i>natural killer</i>
NV:	virus de Norwalk
Poli(A) :	tramo de poliadeninas
SFB:	suero fetal bovino
SMSV:	virus del león marino de San Miguel
rBV:	baculovirus recombinante
RHD:	enfermedad vírica hemorrágica
RHDV:	virus de la enfermedad hemorrágica del conejo
RCV:	lagovirus no patógenos
RPMI:	medio Roswell Park Memorial Institute

SARS:	síndrome respiratorio agudo grave
T:	número de triangulación
TGM:	título geométrico medio
UFP:	unidades formadoras de placa
VESV:	virus del exantema vesicular del cerdo
VLPS:	virus-like particles (pseudo-partículas virales)
VPg:	proteína unida covalentemente al extremo 5' del genoma de FCV
VP1:	proteína de la cápsida de los calicivirus
VP2:	proteína adicional de la cápsida de los calicivirus
VP60	proteína de la cápsida del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV)
VP62	proteína de la cápsida del calicivirus felino (FCV)
WB	inmunodetección de proteínas en membrana (Western blot)

CÓDIGOS DE UNA Y TRES LETRAS PARA LOS AMINOÁCIDOS:

Alanina	Ala, A	Leucina	Leu, L
Arginina	Arg, R	Lisina	Lys, K
Ácido aspártico	Asp, D	Metionina	Met, M
Asparagina	Asn, N	Fenilalanina	Phe, F
Cisteína	Cys, C	Prolina	Pro, P
Ácido glutámico	Glu, E	Serina	Ser, S
Glicina	Gly, G	Tirosina	Tyr, Y
Glutamina	Gln, Q	Treonina	Thr, T
Histidina	His, H	Triptófano	Trp, W
Isoleucina	Ile, I	Valina	Val, V

ÍNDICE

ABSTRACT	1
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. FAMILIA <i>CALICIVIRIDAE</i>	7
1.1.1. Taxonomía y características generales	7
1.1.2. El virión	9
1.1.3. Organización genómica	10
1.2. EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO (RHDV)	12
1.3. CÁPSIDAS VIRALES Y VLPs	14
1.3.1. La cápsida viral	14
1.3.2. Cápsidas virales vacías o VLPs	15
1.3.3. Cápsidas y VLPs de Calicivirus	17
1.4. ESTRATEGIAS VACUNALES BASADAS EN VLPs	19
1.4.1. Vacunas clásicas	19
1.4.2. Vacunas de subunidad	20
1.4.3. Vacunas basadas en VLPs	21
1.4.4. VLPs como vectores vacunales para la presentación de epítopos heterólogo	22
1.4.5. Vacunas basadas en VLPs quiméricas de RHDV	23
1.5. EPÍTOPOS B HETERÓLOGOS	25

2. OBJETIVOS	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1. MATERIALES BIOLÓGICOS	33
3.1.1. Animales	33
3.1.2. Líneas celulares	33
3.1.3. Bacterias	33
3.1.4. Virus	33
3.1.5. Plásmidos	34
3.1.6. Péptidos sintéticos	34
3.2. CULTIVOS CELULARES	35
3.2.1. Mantenimiento de líneas celulares	35
3.2.2. Propagación de virus en cultivos celulares	35
3.2.3. Obtención de células de pulmón murinas	35
3.2.4. Obtención de esplenocitos murinos	36
3.2.5. Cultivos de bacterias	36
3.3. TAMPONES Y MEZCLAS DE REACCIÓN	36
3.4. GENERACIÓN DE VECTORES DE TRANSFERENCIA DE BACULOVIRUS	37
3.5. OBTENCIÓN DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES	38
3.6. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y PURIFICACIÓN DE VLPs	38
3.7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS EN GELES SDS-PAGE Y WESTERN BLOT	39
3.8. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	39

3.9. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	40
3.9.1. Inmunización	40
3.9.2. Experimentos de desafío de ratones con el virus de la gripe	41
3.10. ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE	41
3.10.1. ELISAs para la determinación de títulos de anticuerpos en ratones inmunizados	41
3.10.2. Ensayo de seroneutralización del virus FCV	42
3.10.3. Ensayo de unión de anticuerpos a células MDCK infectadas con el virus de la gripe	43
3.10.4. Ensayo de ELISPOT de células B	44
3.10.5. ELISPOT IFN γ	44
3.11. ENSAYOS DE IDENTIFICACIÓN DE REGIONES LINEALES INMUNODOMINANTES (PEPSCAN) EN LA PROTEÍNA VP60 DE RHDV	45
3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
4. RESULTADOS	47
4.1. INMUNOGENICIDAD DE VLPs QUIMÉRICAS DE RHDV QUE INCORPORAN UN EPÍTOPO B NEUTRALIZANTE DE FCV	49
4.1.1. Generación y caracterización de las VLPs quiméricas RHDV-FCV22	49
4.1.2. Respuesta humoral inducida por las VLPs quiméricas RHDV-FCV22	52
4.1.3. Actividad neutralizantes frente al virus FCV inducida por las VLPs quiméricas RHDV-FCV22	54
4.2. INMUNOGENICIDAD DE VLPs QUIMÉRICAS DE RHDV QUE INCORPORAN EL EPÍTOPO M2e DEL VIRUS DE LA GRIPE A	56
4.2.1. Generación y caracterización de las VLPs quiméricas RHDV-M2e	56

4.2.2. Respuesta humoral inducida por las VLPs quiméricas RHDV-M2e	58
4.2.3. Reactividad frente a células MDCK infectadas con el virus de la gripe de los anticuerpos inducidos por las VLPs quiméricas RHDV-M2e	59
4.3. PROTECCIÓN FRENTE AL VIRUS DE LA GRIPE INDUCIDA POR LAS VLPs QUIMÉRICAS RHDV-M2e EN RATÓN	61
4.3.1. Respuesta humoral inducida (vía subcutánea) por las VLPs quiméricas RHDV-M2e	61
4.3.2. Respuesta celular inducida (vía subcutánea) por las VLPs quiméricas RHDV-M2e	63
4.3.3. Protección inducida por las VLPs quiméricas RHDV-M2e frente a un desafío letal con el virus de la gripe	64
4.3.4. Los títulos de anticuerpos anti-M2e en suero inducidos por las VLPs de RHDV-M2e correlacionan con la protección frente al desafío letal con el virus de la gripe	66
4.4. IDENTIFICACIÓN DE REGIONES LINEALES INMUNODOMINANTES DENTRO DEL SUBDOMINIO P2 DE LA PROTEÍNA VP60	68
5. DISCUSIÓN	73
5.1. INFLUENCIA DEL SITIO DE INSERCIÓN Y EL NÚMERO DE COPIAS DEL EPÍTOPO B HETERÓLOGO EN LA RESPUESTA HUMORAL INDUCIDA POR LAS VLPs QUIMÉRICAS	76
5.2. RESPUESTA INMUNE PROTECTIVA INDUCIDA POR LAS VLPs QUIMÉRICAS QUE INCORPORAN EL EPÍTOPO M2e	79
5.3. IDENTIFICACIÓN DE REGIONES LINEALES INMUNODOMINANTES	82
5.4. CONSIDERACIONES FINALES SOBRE LAS VLPs QUIMÉRICAS DE RHDV QUE INCORPORAN EPÍTOPOS B HETERÓLOGOS	83
6. CONCLUSIONES	85
7. BIBLIOGRAFÍA	89
8. ANEXO I	105

ABSTRACT

Virus-like particles (VLPs), comprised of viral structural proteins devoid of genetic material, are tunable nanoparticles that can be chemically or genetically engineered, to be used as platforms for multimeric display of foreign antigens. In this PhD thesis, we report the engineering of chimeric VLPs, derived from rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) for presentation of foreign B-cell antigens to the immune system. The RHDV is the prototype species of Lagovirus genus within the *Caliciviridae* family. The virus capsid comprises 180 copies of a single capsid subunit (VP60). To evaluate the ability of chimeric RHDV VLPs to elicit protective humoral responses against foreign antigens, we tested two B-cell epitopes: a novel neutralizing B-cell epitope, derived from feline calicivirus capsid protein, and a well characterized B-cell epitope from the extracellular domain of influenza A virus M2 protein (M2e). We generated sets of chimeric RHDV VLPs by insertion of the foreign B-cell epitopes at three different locations within VP60 protein (which involved different levels of surface accessibility) and in different copy numbers per site. The immunogenic potential of the chimeric VLPs was analyzed in the mouse model. The results presented here indicated that chimeric RHDV VLPs elicit potent protective humoral responses against displayed foreign B-cell epitopes, demonstrated by both, *in vitro* neutralization and *in vivo* protection against a lethal challenge.

In addition, we have performed a PEPSCAN analysis to identify linear immunodominant regions within the P2 subdomain of the RHDV capsid protein, aimed at defining new optimized insertion sites for foreign B-cell epitopes. The results obtained enabled the identification of three strong hot spots, one of which presenting structural features potentially compatible for being used as a novel insertion site for the presentation of foreign B cell epitopes.

We have shown (i) that foreign B-cell epitopes can be incorporated at least at three different insertion sites, even simultaneously, without affecting the ability of RHDV VP60 to self- assemble into VLPs, (ii) that RHDV VLPs tolerate the insertion of up to at least three tandem copies of a foreign epitope (62 amino acids) at a surface-exposed insertion site, two tandem copies (42 amino acids) at the N-terminal end of the capsid protein or one copy (22 amino acids) at the C- terminal end, and (iii) that P2 subdomain contains three conserved linear immunodominant sites.

Taken together, the results obtained in this PhD thesis further extend the potential of RHDV VLPs as an excellent novel vaccine platform.

RESUMEN

Las VLPs (virus-like particles) son ensamblados macromoleculares constituidos por proteínas estructurales virales, que carecen de material genético y pueden someterse a modificación química o mediante ingeniería genética, para ser utilizadas como plataformas de presentación multimérica de antígenos foráneos. En esta tesis se describe la generación y caracterización de VLPs quiméricas derivadas del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) incorporando epítomos B heterólogos. El virus RHDV es el prototipo del género *Lagovirus*, perteneciente a la familia *Caliciviridae*. Posee una cápsida formada por 180 copias de la proteína estructural (VP60). Con el fin de evaluar la capacidad de las VLPs quiméricas de RHDV para inducir respuesta humoral específica y protectora frente a antígenos foráneos, seleccionamos dos epítomos B diferentes: un epítomo neutralizante, derivado de la cápsida del calicivirus felino (FCV), recientemente identificado por nuestro grupo, y un epítomo muy bien caracterizado correspondiente al dominio extracelular de la proteína M2 del virus de la gripe (M2e). Se obtuvieron VLPs quiméricas de RHDV con epítomos heterólogos insertados en tres localizaciones distintas de la proteína VP60 y en diferente número de copias por sitio de inserción. La inmunogenicidad de las VLPs quiméricas se evaluó en el modelo murino. Los resultados obtenidos indicaron que las VLPs quiméricas de RHDV son capaces de inducir respuesta humoral específica y protectora frente a los epítomos B foráneos, demostrada tanto por la neutralización *in vitro*, como por la protección *in vivo* inducida frente a un desafío viral letal.

Además, mediante la realización de ensayos de PEPSCAN, en esta tesis se han identificado tres regiones lineales inmunodominantes en el subdominio P2 de la proteína VP60. Una de dichas regiones presenta propiedades estructurales potencialmente adecuadas para constituir un nuevo sitio de inserción de epítomos B heterólogos.

Los resultados presentados demuestran: (i) que se pueden insertar epítomos B foráneos en al menos tres localizaciones diferentes, incluso simultáneamente, sin afectar la capacidad de la proteína VP60 de autoensamblarse en VLPs, (ii) que las VLPs de RHDV toleran la inserción de al menos tres copias en tándem de un epítomo foráneo (62 aa) en el bucle expuesto L1, dos copias (42 aa) en el extremo N-terminal o una copia (22 aa) en el extremo C-terminal, (iii) que el subdominio P2 contiene tres sitios lineales inmunodominantes conservados.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis amplían el potencial de las VLPs de RHDV como plataforma para el desarrollo de nuevas vacunas, demostrando su capacidad para inducir respuestas humorales potentes y protectoras frente a epítomos B heterólogos insertos en ellas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. FAMILIA *CALICIVIRIDAE*.

1.1.1. Taxonomía y características generales.

La familia *Caliciviridae* incluye virus RNA de cadena sencilla que infectan a diversas especies animales incluido el hombre. Las enfermedades causadas por los calicivirus se asocian principalmente con patologías respiratorias, gastrointestinales y hemorrágicas. La imposibilidad de propagar la mayoría de estos virus en cultivos celulares ha dificultado el estudio de sus propiedades biológicas, razón por la cual los calicivirus se encuentran peor caracterizados que otras familias de virus RNA (revisado en: [\(88, 92, 138, 195\)](#)). La clasificación de los calicivirus está en continua revisión debido al constante descubrimiento de virus que se encuadran en nuevos géneros. Actualmente, la familia *Caliciviridae* contiene cinco géneros reconocidos por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV): *Norovirus*, *Sapovirus*, *Vesivirus*, *Nebovirus* y *Lagovirus* [\(45\)](#). Hay cuatro géneros adicionales propuestos: *Recovirus*, *Valovirus*, *Bavovirus* y *Nacovirus* [\(79, 122, 130, 248, 249\)](#). Además, recientemente se ha descrito la secuencia completa de un nuevo calicivirus que infecta al salmón atlántico y que se propone como nuevo género [\(154\)](#), así como la secuencia parcial de un posible nuevo miembro de la familia, el secalivirus, a partir de un análisis metagenómico de aguas residuales, que podría constituir un género adicional [\(164\)](#).

Los norovirus y sapovirus son virus entéricos que causan gastroenteritis en humanos y animales [\(7, 94, 112, 173, 204, 227\)](#). Estudios realizados en los últimos años indican que, en humanos, los norovirus son el principal agente causal de gastroenteritis en adultos [\(118\)](#), ya que se han identificado como responsables de aproximadamente la mitad de los brotes de gastroenteritis a nivel mundial y están considerados como una de las principales causas de las intoxicaciones alimentarias [\(87, 137, 243\)](#). Los norovirus presentan una gran diversidad genética, habiéndose descrito seis genogrupos [\(93, 150, 257\)](#). Históricamente se consideraba que los norovirus eran patógenos exclusivamente humanos, pero desde 1998 se han descrito norovirus porcinos [\(78, 221, 236, 237\)](#), encuadrados en el genogrupo GII junto a las cepas humanas más prevalentes. También se han descrito norovirus bovinos [\(68, 169\)](#), murinos [\(247\)](#), y de carnívoros como el perro y el león [\(143, 144, 150\)](#). Por su parte, los sapovirus humanos causan gastroenteritis principalmente en niños de menores de 5 años [\(4\)](#). Hasta la fecha se han descrito 10 genogrupos, que incluyen virus que infectan al hombre [\(94, 222\)](#), sapovirus porcinos [\(149, 238, 251\)](#) y sapovirus de armiño [\(91\)](#). La estrecha relación genética y antigénica entre norovirus y sapovirus que infectan a humanos o animales plantea interrogantes sobre su potencial zoonótico y la posibilidad de que algunas especies animales, como el cerdo o el perro, constituyan un

reservorio para la emergencia de nuevas cepas epidémicas humanas (3, 59, 144, 237). Si bien hasta la fecha no se ha descrito la infección de humanos por norovirus o sapovirus animales, la detección de norovirus humanos en animales, así como la presencia simultánea de cepas humanas y animales en moluscos destinados al consumo humano, ponen de manifiesto un riesgo potencial de transmisión de cepas animales al hombre (16).

Los vesivirus incluyen patógenos de importancia veterinaria que en conjunto infectan un gran número de especies animales, causando diversas enfermedades como gastroenteritis, lesiones vesiculares, deficiencias reproductivas y hemorragias. Se ha propuesto que los vesivirus proceden de reservorios oceánicos y han emergido posteriormente como patógenos terrestres (211). De hecho, el virus del exantema vesicular porcino (VESV), que circuló por los EE.UU entre los años 30 y 50 del siglo XX causando una patología en cerdos muy similar a la fiebre aftosa, y el virus del león marino de San Miguel (SMSV) constituyen en realidad un único genogrupo (161). Los estudios epidemiológicos indican que el virus VESV surgió a partir del virus SMSV debido a la alimentación del ganado porcino con desechos crudos de origen marino. Un aspecto destacable de los vesivirus es que por lo general se propagan eficientemente en cultivos celulares, a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de los calicivirus de otros géneros (una notable excepción es el norovirus murino, que también puede propagarse en cultivos celulares). Esta característica confiere especial relevancia a los vesivirus, ya que permite el desarrollo de estudios con los integrantes de este género que no son abordables con la mayoría de los calicivirus de otros géneros. El calicivirus felino (FCV) es el vesivirus mejor caracterizado. Conocido desde los años 50, es agente causal de enfermedades respiratorias y estomatitis en gatos (141, 177, 189). Normalmente afecta sólo a las vías respiratorias altas y no suele causar complicaciones serias. Sin embargo, desde 1997 se han descrito en diferentes países varios brotes de una enfermedad sistémica letal (VSD, por *virulent systemic disease*), con mortalidades asociadas superiores al 50%, causada por cepas de FCV de elevada virulencia (VS-FCV), con una sintomatología reminiscente de la provocada por el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (49, 175, 190, 192, 234).

Los nebovirus constituyen un género recientemente aceptado en el que se encuadran virus que infectan bovinos (111, 168).

Los lagovirus infectan lagomorfos (conejos y liebres). El más relevante es el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV), agente causal de una patología de transmisión aerógena altamente contagiosa, asociada con necrosis y hemorragias, que normalmente provoca la muerte de los animales infectados en 24-48 horas, y afecta tanto a poblaciones de conejos domésticos como silvestres (revisado en (2)).

Por último, como se mencionó más arriba, los *Recovirus*, *Valovirus*, *Bavovirus* y *Nacovirus*, son nuevos géneros propuestos, en los que se encuadran virus que infectan primates como el macaco Rhesus, cerdos, y diversas especies de aves de corral (pollos, pavos y gansos) respectivamente (79, 122, 130, 248, 249).

1.1.2. El virión.

Los calicivirus son virus sin envuelta lipídica que poseen una cápsida proteica de simetría icosaédrica en cuyo interior se encuentra el RNA genómico viral. Una característica distintiva de los calicivirus es que la cápsida está constituida por una única proteína estructural, VP1 (60 kDa), lo cual es relativamente común entre los virus de plantas pero infrecuente en virus animales (las otras excepciones son los nodavirus, que infectan artrópodos y peces, y el virus de la hepatitis E). Cuando se observan los viriones sometidos a tinción negativa mediante microscopía electrónica, aparecen como partículas esféricas de 30-40 nm de diámetro (Figura 1.1). Los calicivirus deben su nombre a las características depresiones en forma de copa o cáliz que presenta la cápsida en su superficie (11, 39, 205). La cápsida está compuesta por 180 copias (90 dímeros) de la proteína VP1.

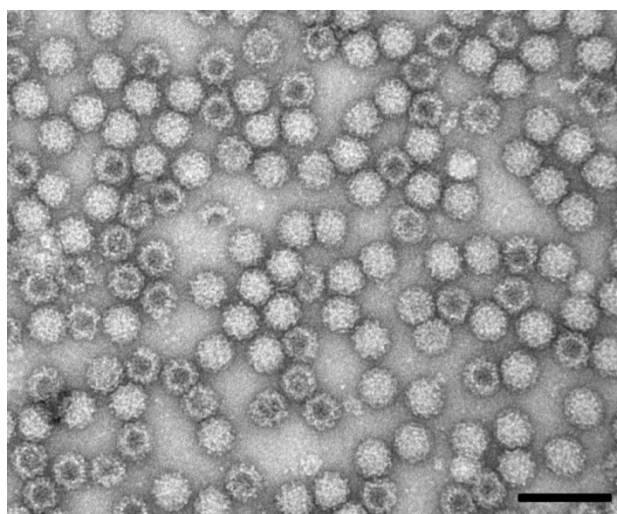


Figura 1.1. Micrografía electrónica de viriones del virus RHDV.
La escala de la barra indica 100nm.

Una característica importante de la proteína de la cápsida de los calicivirus es que tiene la capacidad de autoensamblarse formando pseudo-partículas virales o VLPs (*Virus-Like Particles*), cuando se sintetiza en sistemas de expresión de proteínas recombinantes, que son morfológica y antigénicamente muy similares a la partícula viral (ver apartado 1.3.3) (69, 106, 107, 124).

Los viriones contienen además una proteína, VPg (11-16 kDa), unida covalentemente al extremo 5' del RNA genómico (153, 215), así como la proteína VP2 (10-29 kDa). Esta última se ha detectado en distintos calicivirus en cantidades muy reducidas (una a dos copias por virión) (86, 215, 246). Su carácter básico sugiere que podría jugar un papel similar al del extremo N-terminal de la proteína de la cápsida de algunos virus de plantas (245), implicado en la unión al RNA viral. El extremo N-terminal de la proteína de la cápsida de los calicivirus, VP1, es ácido y por tanto es improbable que esté implicado en la interacción con el genoma del virus.

1.1.3. Organización genómica.

El genoma de los calicivirus está constituido por una molécula de RNA monocatenario de polaridad positiva de 7,4 - 8,3 Kb, unido covalentemente a la proteína VPg en su extremo 5' y poliadenilado en su extremo 3' (88, 195). Presenta una región 5' no traducible (5'UTR) de 4-19 residuos nucleotídicos (nt) (salvo en el caso de los Nebovirus cuya longitud es de 75 nt), que es extremadamente corta en comparación con la de la mayoría de los RNA mensajeros eucarióticos descritos, que suele ser de 20-100 nt (120), o en comparación con los miembros de otras familias de virus RNA de polaridad positiva, que cuentan con regiones 5'UTR complejas (forman elementos estructurales del tipo de los IRES), que abarcan cientos de nucleótidos. Cuenta también con una región 3' no traducible (3'UTR) de una longitud de 43-215 nt, que precede a la cola de poli(A).

La región codificante de la familia *Caliciviridae* presenta 2 ó 3 fases abiertas de lectura (ORF, *Open Reading Frame*) según los géneros (195) (Figura 1.2). Los virus encuadrados en los géneros: *Sapovirus*, *Nebovirus* y *Lagovirus*, (así como en los géneros propuestos: *Valovirus*, *Bavovirus* y *Nacovirus*) cuentan con una primera fase abierta de lectura, ORF1, que representa el 95% del genoma, y que codifica una poliproteína precursora de las proteínas no estructurales, seguidas de la proteína de la cápsida VP1. A continuación, solapándose un reducido número de nucleótidos con la ORF1, se encuentra la ORF2, que codifica la proteína VP2.

El otro modelo de organización, propio de los géneros *Norovirus* y *Vesivirus* (así como el género propuesto *Recovirus*), presenta tres fases abiertas de lectura. La ORF1 codifica una poliproteína de menor tamaño que la descrita en el caso anterior, ya que no incluye la proteína de la cápsida, VP1, que es codificada por la ORF2. A continuación la ORF3, situada en el extremo 3' de la región codificante, se solapa en un reducido número de nucleótidos con la ORF2 y codifica la proteína VP2 (Figura 1.2).

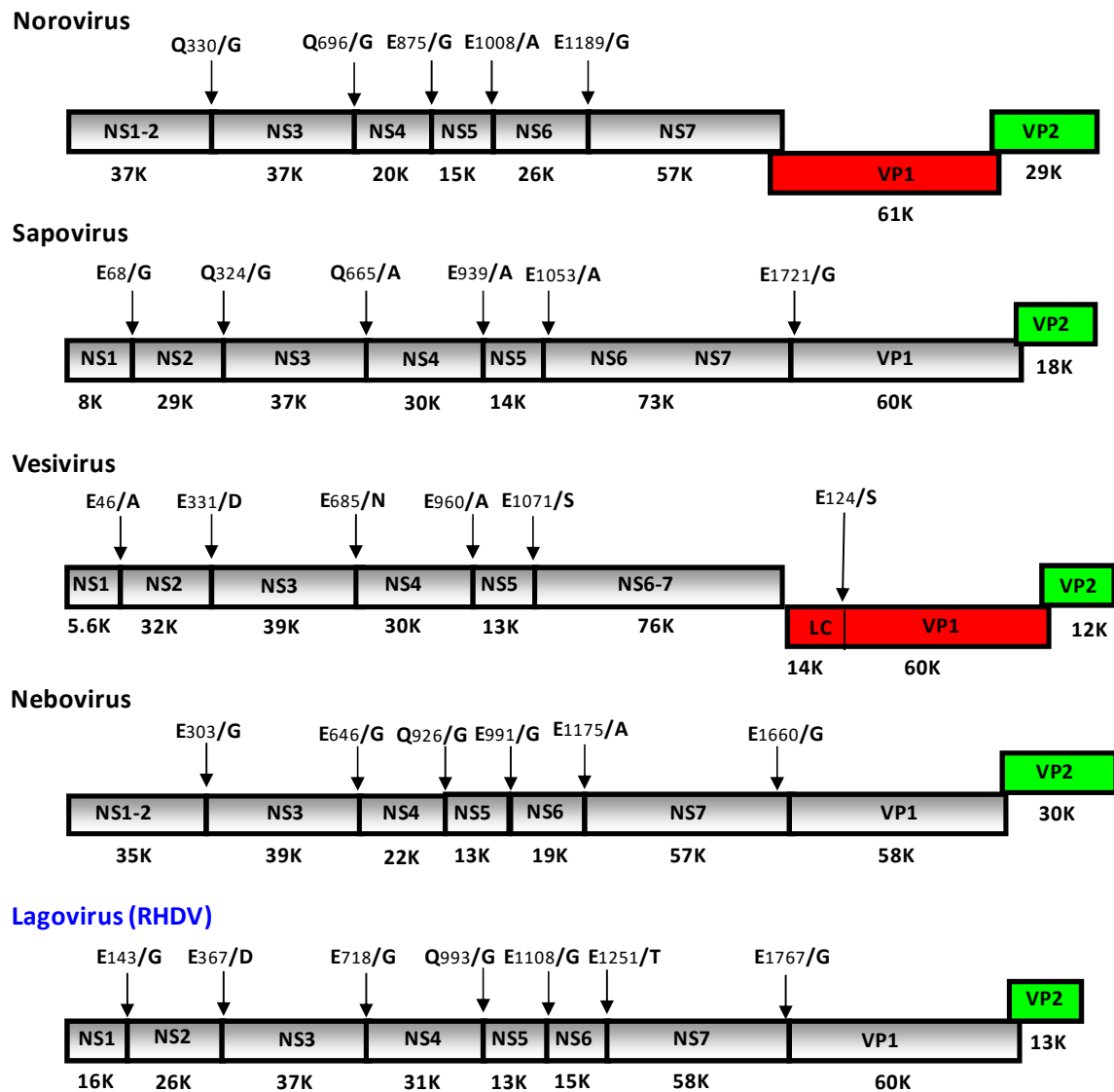


Figura 1.2. Comparación de la organización genómica de los 5 géneros reconocidos de calicivirus. Las flechas indican los puntos de procesamiento proteolítico de la poliproteína, para generar las proteínas virales maduras.

Por último, aparte del RNA genómico, todos los calicivirus producen altos niveles de un RNA subgenómico bicistrónico de 2.2-2.4 Kb en las células infectadas (73, 96, 166). Dicho RNA subgenómico corresponde al último tercio del RNA viral y se genera por iniciación interna durante la replicación del RNA genómico (151, 152). El RNA subgenómico codifica la proteína VP1, lo que permite la expresión de grandes cantidades de dicha proteína durante el ciclo viral, y también codifica la proteína VP2, que se expresa a niveles más bajos.

1.2. EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD HEMORRAGICA DEL CONEJO (RHDV).

El RHDV es un virus emergente. Se describió por primera vez en China en 1984 (133). La enfermedad se diseminó entre los años 1986-1989 de forma epizootica por Asia, Europa y Norte de África, afectando tanto a poblaciones de conejos domésticos como silvestres, diezmando severamente sus poblaciones (2, 47). Posteriormente se detectó en varios países americanos, y en 1995 fue introducido accidentalmente en Australia, tras producirse un escape viral desde una isla situada a 4 km del continente, donde se desarrollaban ensayos orientados a la utilización del virus como agente de control biológico del conejo (46, 81). Poco tiempo después se introdujo ilegalmente en Nueva Zelanda. Actualmente tiene una distribución global, habiéndose detectado en más de 40 países de los cinco continentes.

El origen del virus RHDV es confuso. Estudios serológicos realizados con colecciones de sueros de conejo antiguas conservadas en laboratorios (años 60-70), o con muestras procedentes de conejos domésticos y silvestres en zonas en las que no se habían descrito previamente brotes de RHDV, detectaron serología positiva al virus, apuntando a la existencia de lagovirus antigénicamente relacionados con el virus RHDV en fechas muy anteriores al año de emergencia del virus (193). Dichos virus habrían circulado inadvertidamente durante décadas sin causar signos clínicos aparentes en poblaciones de conejos de Europa, Australia y Nueva Zelanda, con anterioridad a la emergencia del virus RHDV. Posteriormente, esta hipótesis se confirmó con el aislamiento de lagovirus no patógenos (que se denominan RCV para distinguirlos de los virus RHDV virulentos) a partir de conejos domésticos o silvestres en distintos países de Europa, América y Oceanía (26, 41, 83, 127, 220). Los virus RCV se propagan principalmente en el intestino (al igual que los calicivirus de otros géneros como los norovirus y los sapovirus), sin causar signos clínicos aparentes en los conejos infectados, mientras que el virus RHDV presenta un tropismo de órgano diferente, ya que se propaga principalmente en hígado y bazo, provocando la muerte de los conejos infectados normalmente en 48-72 horas. En cuanto a la relación antigénica entre los virus RCV y RHDV, los distintos experimentos que se han realizado inoculando conejos con virus RCV y posteriormente desafiándolos con virus RDHV, indican que existe un gradiente de protección cruzada, de manera que hay cepas de RCV (cepa italiana) que confieren protección completa (41), otras (cepa australiana) confieren protección parcial (219), y otras (cepa francesa) que no confieren protección alguna (127). Naturalmente, la existencia de dichos RCV y su co-circulación con las cepas de RHDV, tiene profundas implicaciones en la epidemiología de estas últimas y su impacto sobre las poblaciones de conejos (158, 242). Los estudios filogenéticos indican que los diversos virus RCV se encuentran relativamente alejados de las cepas de RHDV y

entre sí (127). Se piensa que el virus RHDV evolucionó a partir de un lagovirus pre-existente, similar a alguno de los virus RCV actuales, mediante sutiles cambios genéticos que afectaron al tropismo y la virulencia del virus (99, 115, 127).

En el año 2010 se identificó en Francia un nuevo lagovirus, el virus RHDV2, con características diferenciadas, tanto de las cepas del virus virulento RHDV como de los virus no patogénicos RCV (125, 126). En síntesis, el nuevo virus RHDV2 es patogénico en conejos, a diferencia de los virus RCV. Sin embargo, la enfermedad que produce es diferente a la provocada por el virus RHDV, y se conoce como nueva variante de RHD. Las principales diferencias de la enfermedad causada por el virus RHDV2 respecto a la RHD convencional son: (i) afecta a conejos que habían sido previamente inmunizados con vacunas frente al virus RHDV (65, 125, 126); (ii) afecta a gazapos menores de 2 meses que no son susceptibles al virus RHDV (66, 125); (iii) afecta a otras especies de lagomorfos, como la liebre del cabo (*Lepus capensis mediterraneus*) (187); (iv) presenta un grado de patogenicidad algo menor, con tasas de mortalidad que oscilan entre el 10% en adultos hasta aproximadamente el 50% en gazapos menores de 35 días (125). El nuevo virus RHDV2 se detectó por primera vez en España a finales de 2011, tanto en explotaciones de conejos domésticos como en poblaciones silvestres (40, 66), en el tercio norte peninsular. Posteriormente, el virus RHDV2 ha extendido rápidamente su distribución a otros países europeos (1, 12, 125, 187, 241) así como por toda la península ibérica (65). A pesar de su reciente aparición, el nuevo virus ya es responsable de elevadas pérdidas económicas en la cunicultura y tiene un impacto relevante en el ecosistema mediterráneo.

La proteína de la cápsida, VP1, de 60 kDa, se conoce también como VP60 en el caso de los lagovirus. Dicha proteína, expresada en diversos sistemas heterólogos (bacterias, baculovirus, levaduras, poxvirus, plantas, etc.) ha demostrado ser altamente inmunogénica y suficiente para inducir protección en conejos frente a infecciones letales con RHDV (6, 20, 27, 33, 34, 43, 124, 142, 159, 176, 231, 232). Tiene la capacidad de autoensamblarse formando VLPs, que son morfológica y antigénicamente muy similares a la partícula viral (124, 159), razón por la cual las VLPs de RHDV resultan excelentes herramientas para el desarrollo tanto de nuevas estrategias vacunales como de sistemas de diagnóstico frente al virus. La información disponible sobre las secuencias de la proteína VP60 de cepas de los virus RHDV, RCV y RHDV2, indican una elevada homología entre ellas (65, 125), de manera que las cepas de RHDV tienen entre sí una identidad de secuencia que suele ser superior al 96%, en tanto que al comparar las secuencias de cepas de RHDV2 con cepas de RCV o RHDV, la identidad de secuencia desciende a 87-89%.

1.3. CÁPSIDAS VIRALES Y VLPs.

1.3.1. La cápsida viral.

Los virus representan un paradigma en la economía de la información genética, tanto en su estrategia de reproducción y diseminación, como en su propia construcción. Realizan todas sus funciones vitales mediante un reducido número de proteínas codificadas por genomas relativamente pequeños. En el caso de la formación de la partícula viral la economía genética llega a una elevada sofisticación; sólo una o unas pocas proteínas diferentes son necesarias para dar lugar a una compleja envoltura que lleva a cabo múltiples funciones: selecciona el ácido nucleico viral en el entorno celular, facilita su salida de la célula infectada, protege el genoma viral durante la fase extracelular del ciclo del virus, reconoce receptores celulares específicos en la siguiente célula huésped, se internaliza en ella y, finalmente, libera el ácido nucleico en la nueva célula dando lugar a un nuevo ciclo de replicación. Algunas cápsidas incluso participan activamente en la replicación del genoma viral. Además, en el caso de virus que infectan animales vertebrados, la superficie de la cápsida debe por un lado mantener regiones conservadas que permitan el reconocimiento de receptores celulares, compaginando esto con elevadas tasas de mutación en otras regiones superficiales, como estrategia que permite a los virus evadir la respuesta inmune que desarrollan los organismos infectados (145).

Por tanto, la visión de las cápsidas virales como estructuras cerradas inertes, meros contenedores del material genético, es poco adecuada ya que estas experimentan profundas modificaciones estrechamente relacionadas con el momento del ciclo viral (147). La estructura de la cápsida puede ser considerada un compromiso entre la estabilidad, necesaria para que los virus sobrevivan en el medio extracelular, y la inestabilidad, ya que deben ser capaces de convertirse en estructuras lábiles para liberar el genoma viral en la célula infectada. Este estado metaestable es posible debido a que las subunidades proteicas que integran la cápsida viral, interaccionan mediante enlaces débiles de tipo no covalente. En la inmensa mayoría de los casos estudiados, la estabilidad de la partícula viral se consigue mediante la cooperación de una gran cantidad de interacciones de tipo iónico e hidrofóbico.

Para poder conjugar todas las funciones que deben cumplir las cápsidas virales a lo largo del ciclo viral, así como adaptarse a las presiones selectivas a que se ven sometidos, los virus han desarrollado soluciones estructurales únicas (15, 109, 167, 185). Dada la limitada capacidad codificante impuesta por el tamaño de su genoma, los virus han adoptado arquitecturas basadas en el uso de relaciones de simetría y el polimorfismo estructural de las proteínas de la cápsida. Sin

considerar las envueltas lipídicas, la mayor parte de los virus presentan cápsidas con simetría helicoidal o icosaédrica (185). En el primer caso las subunidades que conforman la cápsida se disponen en hexámeros planos, que proporcionan entornos idénticos, con un determinado ángulo de curvatura impuesto por las interacciones entre las subunidades y que determina el diámetro del tubo. El icosaedro es un sólido formado por veinte caras triangulares y sesenta posiciones equivalentes relacionadas por ejes de simetría rotacional de orden 2, 3 y 5. Un ensamblado icosaédrico se forma a partir de doce pentámeros (convexos) que introducen curvatura y permiten el ensamblaje de estructuras cerradas (13). La cápsida icosaédrica más simple es la formada por 60 subunidades idénticas dispuestas en 12 pentámeros. La arquitectura de las cápsidas virales formadas por más de 60 subunidades se define según la teoría de la cuasiequivalencia (42). Dichas cápsidas más grandes (integradas por múltiplos de 60 subunidades), se forman mediante el establecimiento de interacciones cuasiequivalentes (no idénticas) entre sus subunidades, que se ensamblan tanto en pentámeros como en hexámeros. Para ello es necesaria una cierta flexibilidad conformacional de la subunidad estructural, que se consigue mediante diferentes factores denominados interruptores moleculares y/o mediante proteínas auxiliares como proteínas de andamiaje, accesorias y/o proteasas (185). Algunas cápsidas están constituidas por distintas proteínas con conformaciones similares en lugar de una única proteína estructural con ligeras variaciones en su conformación: en este caso se habla de pseudoequivalencia.

1.3.2. Cápsidas virales vacías o VLPs.

Las VLPs son ensamblados macromoleculares que presentan un alto grado de simetría y una geometría bien definida, normalmente helicoidal o icosaédrica, con un diámetro en el rango de 20-120 nm (180, 188) Figura 1.3. Se basan en la capacidad intrínseca que presentan las proteínas estructurales de muchos virus para autoensamblarse espontáneamente, dando lugar a la formación de partículas similares a virus o cápsidas vacías (*virus-like particles*, VLPs), cuando dichas proteínas virales se producen mediante sistemas de expresión de proteínas recombinantes. Las VLPs mimetizan la estructura y conformación de auténticos viriones, con o sin envoltura lipídica, dependiendo del virus de origen y de las proteínas virales empleadas (proteínas de la cápsida o proteínas virales de membrana), o en algunos otros casos constituyen partículas subvirales (cuando se emplean proteínas estructurales internas de algunos virus).

Puesto que las VLPs son por lo general estructuralmente indistinguibles de las correspondientes partículas virales, mantienen muchas de las propiedades de estas, como la capacidad de unión a receptores celulares e internalización en las células hospedadoras, así como

sus características de antigenicidad e inmunogenicidad. Pero, a diferencia de las partículas virales auténticas, las VLPs no tienen capacidad de replicación ya que carecen de genoma viral, y son por lo tanto no infecciosas.

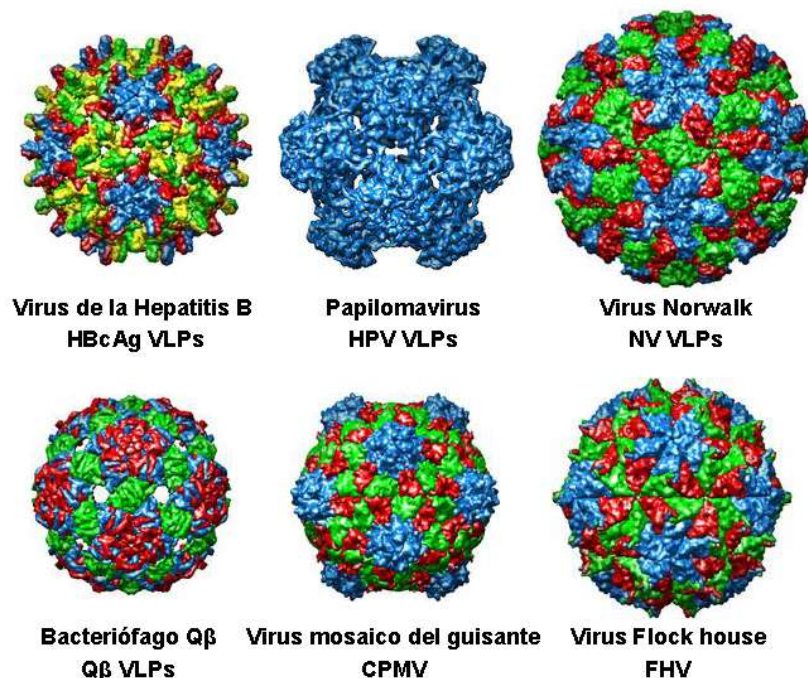


Figura 1.3. Ejemplos de cápsidas virales y VLPs. Cápsidas del virus de la hepatitis B (PDB 1QGT), del papilomavirus humano (1DZL), del virus Norwalk (1IHM), del bacteriófago Qβ (1QBE), del virus del mosaico del guisante (1NY7) y del virus Flock House (2Z2Q). Figura adaptada a partir de (17).

Por todo ello, las VLPs constituyen una poderosa herramienta en virología, especialmente para ser empleadas como alternativa a las partículas virales en el caso de virus que no pueden propagarse eficientemente en cultivos celulares (como los calicivirus o los virus de la hepatitis B y C), o aquellos cuyo manejo requiere medidas especiales de contención por razones de bioseguridad (como el virus Ébola o SARS). Las VLPs se han utilizado intensivamente con distintos fines: en estudios básicos sobre estructura, función y ensamblaje de las cápsidas de numerosos virus (28, 131, 140), como vectores en sistemas de transferencia genética (75, 233), o como reactivos de diagnóstico, para la detección de serología positiva frente a los virus de los que proceden (3, 68, 206). Y sobre todo, las VLPs representan una alternativa muy prometedora para el desarrollo de nuevas estrategias vacunales frente a infecciones virales (17, 121, 180) (ver apartado 1.4).

Hasta la fecha se ha descrito la producción de más de 110 VLPs a partir de virus encuadrados en 35 familias virales diferentes, taxonómica y estructuralmente muy diversos, que infectan tanto

a humanos y otros animales, como a plantas, hongos y bacterias (121, 188, 255). Esto incluye virus cuya cápsida está compuesta por una única proteína viral, virus con cápsidas compuestas por varias proteínas, virus con una o varias cubiertas proteicas y virus con envuelta lipídica, lo que indica que la posibilidad de obtención de VLPs no se circunscribe a determinadas familias virales, ni se ve limitada por la complejidad estructural de la partícula viral.

1.3.3. Cápsidas y VLPs de Calicivirus.

Mediante técnicas de criomicroscopía electrónica (crioME) y reconstrucción tridimensional de imágenes se han determinado, a resoluciones en el rango de los 20-25 Å, las estructuras tridimensionales de las cápsidas o VLPs de calicivirus de diversos géneros (Figura 1.4) como: VLPs del norovirus NV (184), VLPs del sapovirus Parkville (61), VLPs del lagovirus RHDV (22), y viriones del vesivirus SMSV (62).

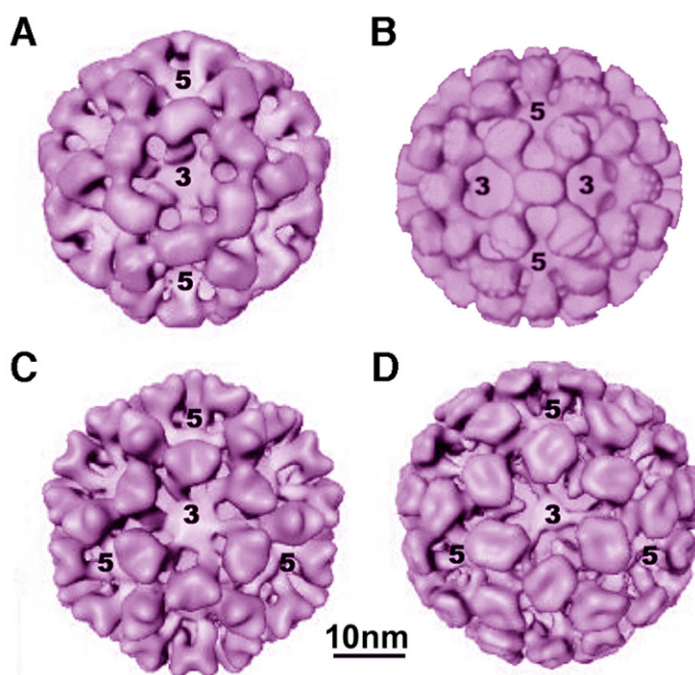


Figura 1.4. Estructura de la cápsida de los calicivirus. Mapas tridimensionales de miembros de cuatro géneros de la familia *Caliciviridae* a una resolución de ~22 Å: (A) VLPs de NV (norovirus); (B) VLPs de RHDV (lagovirus); (C) VLPs del virus Parkville (sapovirus) y (D) viriones de SMSV (vesivirus). Se indican los ejes de simetría de orden 5, 3 y 2. La barra representa 100 Å.

Las cápsidas de los calicivirus son estructuras con simetría icosaédrica T=3 y diámetros de ~35-40 nm, en las que se localizan 32 depresiones en forma de copa y 90 capsómeros protuberantes, que se disponen formando 12 pentámeros y 20 hexámeros. La cápsida viral se compone de 180 copias de la proteína estructural VP1 y cada capsómero individual está constituido por un dímero de dicha proteína.

Hasta el momento se ha determinado mediante difracción de rayos X la estructura a resolución atómica de la proteína de la cápsida del norovirus NV (183) y de los vesivirus SMSV y FCV (60, 170). En general, cada monómero de la cápsida (VP1) contiene tres dominios estructurales: un brazo N-terminal (NTA), un dominio S (*Shell* o armazón) y un dominio P (*protruding* o protuberante). En la cápsida el dominio N-terminal queda situado hacia el interior. El dominio S contiene un barril β canónico, formado por 8 cadenas β antiparalelas, y es responsable de formar la cubierta continua (*shell*) esférica de la cápsida. Posee elementos esenciales para la formación de los contactos icosaédricos entre los dímeros de VP1. El dominio P forma las estructuras protuberantes que sobresalen en la superficie de la cápsida de los calicivirus. Participa en los contactos intradiméricos que incrementan la estabilidad de la cápsida y se conecta al dominio S mediante una región flexible (*hinge*). El dominio P se subdivide a su vez en los subdominios P1 y P2. El subdominio P2 puede considerarse una inserción dentro del subdominio P1 y se localiza dentro de las estructuras protuberantes en las zonas más expuestas a la superficie de la cápsida. Dicho subdominio posee una estructura que se encuentra conservada en sus rasgos generales entre los diversos calicivirus, a pesar de que es la zona con más variabilidad de secuencia de la proteína, tanto entre los distintos calicivirus como entre las distintas cepas de un mismo virus. En varios calicivirus se ha visto que el subdominio P2 contiene epítomos reconocidos por anticuerpos neutralizantes, situados en bucles expuestos a la superficie (114, 116, 135, 213, 229), y se ha demostrado también que está implicado en la unión del virus con su receptor (31, 113, 170, 209, 225).

En cuanto a la cápsida del virus RHDV (Figura 1.5), objeto de estudio de la presente tesis, nuestro grupo mantiene una línea de trabajo orientada al análisis estructural de la proteína VP60 en colaboración con el grupo de José Ruiz Castón (CNB-CSIC), basada en la combinación de técnicas de criome y procesamiento digital de imágenes. Como resultado, inicialmente se estableció un modelo de la estructura tridimensional de la cápsida de RHDV a 24 Å de resolución, lo que a su vez permitió obtener un pseudomodelo atómico de la proteína VP60 por comparación con las estructuras atómicas resueltas de la cápsida de otros calicivirus (22). Posteriormente se refinó el modelo estructural de la cápsida de RHDV hasta una resolución de 8 Å, con la consiguiente mejora del pseudomodelo atómico de la proteína VP60 (139). La disponibilidad del mencionado pseudomodelo atómico ha permitido a nuestro grupo contar con un marco de actuación racional para el diseño de VLPs quiméricas basadas en el virus RHDV, orientadas al desarrollo de nuevas vacunas (50, 53) (ver apartado 1.4.5), sin disponer de la estructura atómica de la proteína resuelta por difracción de rayos X. Recientemente se ha resuelto por separado la estructura atómica de los dominios S y P de la proteína VP60 de RHDV (240).

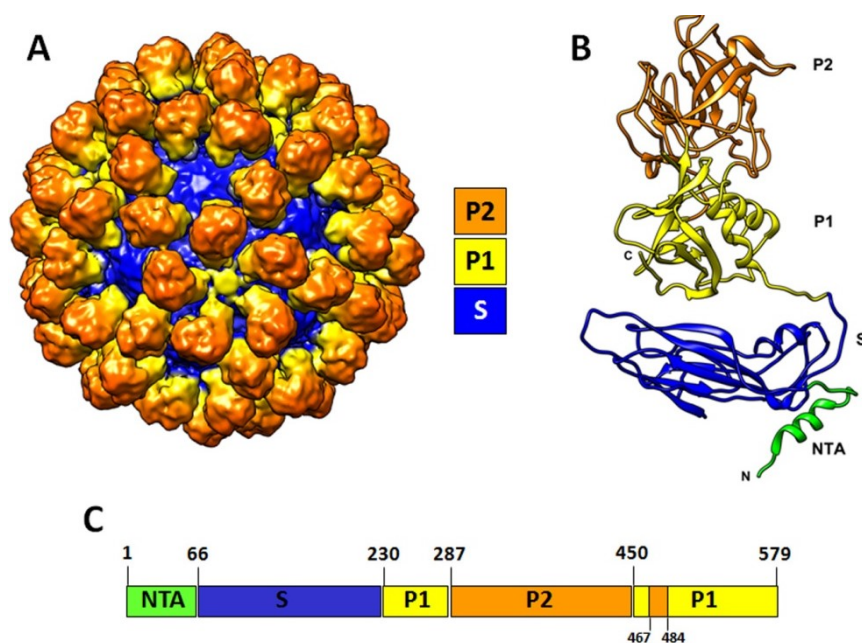


Figura 1.5. Estructura de la cápsida de RHDV y de la proteína VP1. (A) Reconstrucción tridimensional de la cápsida del virus RHDV a partir de imágenes de criomicroscopía electrónica de VLPs. (B) Modelo atómico de un monómero de la proteína de la cápsida de RHDV VP1, también conocida como VP60 (PDB 3J1P). (C) Esquema que ilustra la localización de los dominios de la proteína VP1 en la secuencia lineal. El extremo amino terminal (NTA) se representa en verde, el dominio S en azul, el subdominio P1 en amarillo y el subdominio P2 en naranja.

1.4. ESTRATEGIAS VACUNALES BASADAS EN VLPs.

1.4.1. Vacunas clásicas.

La vacunación es uno de los métodos más eficaces para prevenir las enfermedades infecciosas. Buena parte de las vacunas empleadas en la actualidad se basan en formas atenuadas o inactivadas del patógeno original, tal como las vacunas Sabin o Salk contra la poliomielitis (201, 202), o la vacuna contra la fiebre aftosa (FA) (23). Muchas de estas vacunas clásicas, en particular las atenuadas, inducen una potente respuesta de células B (respuesta humoral) y de células T (respuesta celular), lo que se traduce en una eficaz protección frente a la infección. Esto ha permitido éxitos muy notables en el control e incluso erradicación de enfermedades, logrados gracias al empleo de este tipo de vacunas (179).

Sin embargo, el empleo de las vacunas convencionales puede plantear inconvenientes relacionados con la bioseguridad. Así, existe un riesgo, limitado aunque presente, de reversión del patógeno atenuado a un fenotipo virulento, o bien de que se produzca una inactivación incompleta o se dé un escape durante el proceso de producción de las vacunas, que puede provocar el desencadenamiento de brotes de la enfermedad que se pretende combatir, precisamente a partir de

la producción o el empleo de las vacunas frente a la misma. Por ejemplo, la poliomielitis es una enfermedad que se considera esencialmente erradicada en los países occidentales, y los últimos casos reportados están ligados al uso de vacunas (71). De forma similar, buena parte de los últimos brotes de FA registrados en países de la Unión Europea han resultado ser de origen vacunal (24, 48). El empleo de vacunas atenuadas está contraindicado en el caso de individuos inmunocomprometidos o recién nacidos. En el campo veterinario, el empleo de vacunas clásicas generalmente no permite una clara discriminación serológica entre animales vacunados y animales infectados, un requisito necesario para el acceso a los mercados internacionales de productos ganaderos. Por este motivo, los países de la UE y de otras regiones del mundo siguen una política de no vacunación frente a importantes enfermedades infecciosas de las especies ganaderas (como la FA, peste porcina africana o la peste porcina clásica), basada en el sacrificio de los animales infectados y las poblaciones expuestas (*stamping out*), junto con estrictas limitaciones del movimiento de animales. En consecuencia, la cabaña ganadera europea es altamente susceptible a dichas enfermedades, lo que conlleva un riesgo importante de reintroducción de las mismas en el actual contexto de globalización de la economía. Otro aspecto relevante relacionado con los procedimientos de producción de vacunas clásicas frente a virus patógenos, tanto en el ámbito humano como el veterinario, es la necesidad de disponer de sistemas de cultivos celulares adecuados para la propagación de dichos virus, lo cual no siempre es posible o aconsejable por razones técnicas o de bioseguridad. Por último, los abordajes tradicionales han mostrado limitaciones para el desarrollo de vacunas eficaces frente a patógenos que subvierten, dañan o evaden la respuesta inmune del hospedador, como ocurre en el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

1.4.2. Vacunas de subunidad.

Lo expuesto más arriba pone de manifiesto la necesidad del desarrollo de nuevas estrategias vacunales que superen los inconvenientes y limitaciones que presenta el abordaje de las vacunas clásicas. Una alternativa considerada más segura es el desarrollo de vacunas sintéticas o de subunidad, basadas en la utilización de componentes aislados derivados de los patógenos, como proteínas recombinantes o péptidos sintéticos. Estas vacunas son intrínsecamente más seguras que las convencionales, puesto que no implican el manejo de patógenos potencialmente peligrosos, ni durante su producción ni en su administración. Por otra parte, en el ámbito veterinario, las vacunas de subunidad permiten la discriminación serológica entre animales vacunados y animales infectados (las llamadas vacunas marcadoras o vacunas DIVA). Sin embargo, aunque en ciertos casos este abordaje ha demostrado ser una alternativa eficaz a las vacunas

convencionales, es conocido que por lo general este tipo de antígenos son débilmente inmunogénicos *per se* (194), por lo que se suele requerir un mayor número de dosis y/o más cantidad de inmunógeno para alcanzar niveles adecuados de eficacia (lo que repercute negativamente en el coste de las vacunas), y además requieren ser formuladas empleando potentes adyuvantes, que pueden presentar efectos secundarios nocivos (como toxicidad o dolor). Por estas razones, el desarrollo de estrategias capaces de incrementar la eficacia de las vacunas sintéticas o de subunidad resultan muy relevantes de cara a hacer viable la generalización de su uso (156).

Una de las razones por la que las infecciones virales evocan por lo general una fuerte respuesta inmune se debe a la particular estructura de la superficie de los virus, que pueden ser considerados como cristales de dos dimensiones. La disposición altamente repetitiva y estructurada de los epítomos en la superficie viral es una característica distintiva de los mismos, así como de otros microorganismos, que los diferencia en buena medida de las características que presenta la superficie de las células eucariotas que componen el organismo infectado. Puesto que el sistema inmune de los vertebrados ha evolucionado orientado a la discriminación entre lo propio y lo ajeno, ha desarrollado diversos mecanismos especializados en el reconocimiento y eliminación de este tipo de estructuras repetitivas que presentan una organización cuasi-cristalina.

Por lo tanto, una alternativa plausible para tratar de potenciar la inmunogenicidad de un antígeno de interés (una proteína completa de un patógeno o bien un fragmento que contenga epítomos inmunogénicos relevantes) es presentarlo al sistema inmune en una forma multimérica, altamente repetitiva y estructurada, de modo similar a como son presentados los antígenos en la superficie de los virus.

1.4.3. Vacunas basadas en VLPs.

Puesto que las VLPs mimetizan la estructura general de las partículas virales (aunque carecen de material genético y por tanto de infectividad), resultan ser altamente inmunogénicas, razón por la cual pueden emplearse para el desarrollo de vacunas frente a los virus de los que derivan, constituyendo un tipo particularmente efectivo de vacunas de subunidad.

Las vacunas basadas en VLPs combinan muchas de las ventajas de las vacunas basadas en virus completo con las propias de las vacunas de subunidad recombinantes, presentando un alto perfil de seguridad. VLPs producidas mediante el empleo de sistemas de expresión de proteínas recombinantes (obviando así la necesidad de manejar grandes cantidades de virus patógenos),

pueden inducir una respuesta inmune innata, mediante la activación de distintos tipos de células presentadoras de antígeno (CPA), como los macrófagos y las células dendríticas, una potente respuesta inmune humoral mediada por células B, la proliferación de linfocitos CD4 (respuesta *T helper*), la inducción de respuesta T citotóxica (respuesta CTL) mediada por linfocitos CD8, y en último término la formación de células B de memoria, el objetivo fundamental de toda vacuna. Además, las vacunas basadas en VLPs, por ser un caso particular de vacunas subunidad, son compatibles con los requerimientos de las vacunas DIVA. Este conjunto de características, que raramente reúne otro tipo de vacunas de subunidad, hacen de las VLPs buenos candidatos para el desarrollo de vacunas frente a enfermedades víricas (17, 38, 51, 52, 89, 100, 196, 200).

En la actualidad existen vacunas basadas en VLPs en varias fases de desarrollo, que abarcan desde las evaluaciones preclínicas hasta el mercado. Ya se encuentran disponibles comercialmente vacunas basadas en VLPs frente a la hepatitis B (Recombivax® de Merck y Engerix® de GlaxoSmithKline, en uso desde 1986) y el papilomavirus humano (Gardasil® de Merck y Cervarix™ de GlaxoSmithKline, autorizadas en 2006 y 2009, respectivamente) (55). Otras vacunas frente a enfermedades víricas humanas basadas en VLPs, en fase avanzada de desarrollo clínico, incluyen algunas dirigidas frente al parvovirus humano (B19), el virus Norwalk, rotavirus y el virus de la gripe (37, 104, 180, 196). En el campo veterinario, actualmente está en el mercado una vacuna basada en VLPs frente al circovirus porcino tipo 2 (Porcilis PCV® de Intervet, desde 2009), y otros candidatos vacunales prometedores en distintas fases de desarrollo incluyen: vacunas frente al virus de la lengua azul, el virus de la bursitis infecciosa, el virus RHDV, nodavirus, el virus de la enfermedad de Newcastle o el virus de la gripe aviar (36, 51, 132).

1.4.4. VLPs como vectores vacunales para la presentación de epítomos heterólogos.

A la vista de las excepcionales características de las VLPs como inmunógenos, pronto se planteó la posibilidad de emplearlas como vectores vacunales para la inducción de respuesta inmune frente a antígenos foráneos. Es decir, el empleo de las VLPs como “vehículo” para exponer al sistema inmune antígenos heterólogos incorporados en su superficie, derivados de patógenos distintos al virus del que proceden las proteínas que componen las VLPs. Los antígenos heterólogos pueden incorporarse a las VLPs bien mediante fusión genética (VLPs quiméricas) o mediante conjugación química (VLPs conjugadas). Esta estrategia ha permitido trasladar a muy diversos antígenos las ventajas inmunogénicas inherentes a las VLPs (naturaleza particulada, presentación multimérica y altamente estructurada, capacidad de activación de CPAs), exponiéndolos al sistema inmune en un contexto particularmente adecuado para la inducción de una potente respuesta inmune (10, 37, 55, 180).

Hasta muy recientemente, las vacunas se empleaban exclusivamente para la prevención de enfermedades infecciosas (vacunas profilácticas). Esta situación está evolucionando rápidamente, de manera que en la actualidad se realizan importantes esfuerzos orientados al desarrollo de vacunas terapéuticas dirigidas frente a enfermedades crónicas, como el cáncer, alzheimer, artritis, enfermedades autoinmunes o alergias, incluso se persigue el desarrollo de vacunas frente a nuevas indicaciones, como la hipertensión o la dependencia a la nicotina (8, 72, 105). A este respecto, cabe destacar que la eficacia de las VLPs en la inducción de una potente respuesta inmune humoral frente a epítomos heterólogos incorporados en su superficie es tal, que se han empleado con éxito para la obtención de anticuerpos autoinmunes, lo que conlleva sobrepasar los mecanismos de tolerancia que presentan las células B frente a los antígenos propios (56-58). Por lo tanto, las VLPs pueden actuar no sólo como vectores para la presentación de antígenos inmunogénicos derivados de patógenos infecciosos microbianos en vacunas profilácticas, sino también como presentadoras de antígenos propios en vacunas terapéuticas.

Actualmente, la disponibilidad de información sobre la estructura a alta resolución de numerosas cápsidas virales (44, 108, 146, 185, 198), proporciona un marco de actuación racional para la modificación de VLPs orientada al diseño de nuevas estrategias vacunales basadas en VLPs quiméricas (17, 110, 148). VLPs derivadas de 14 familias virales distintas, incluyendo virus DNA o RNA de cadena simple y de doble cadena, se han empleado con éxito para la presentación de antígenos heterólogos (10, 55, 188, 196). Los resultados obtenidos empleando VLPs derivadas de diferentes virus como hepatitis B, papilomavirus, parvovirus, calicivirus o bacteriófagos, han ilustrado la capacidad de este abordaje vacunal para inducir una potente respuesta inmune específica frente a epítomos B y T incorporados en su superficie (37, 165, 171, 180).

1.4.5. Vacunas basadas en VLPs quiméricas de RHDV.

Las VLPs derivadas del virus RHDV resultan buenas candidatas potenciales para el desarrollo de vacunas basadas en VLPs, ya que: (i) están compuestas por una única proteína; (ii) son altamente inmunogénicas; (iii) son bastante estables; (iv) pueden purificarse con relativa facilidad en grandes cantidades. Se ha demostrado que las VLPs de RHDV confieren protección total frente a un desafío letal con el virus en conejos inmunizados (124, 160, 176, 178).

Nuestro grupo viene trabajando en los últimos años en la producción y caracterización de VLPs quiméricas derivadas del virus RHDV, orientada al desarrollo de vacunas de interés veterinario. El trabajo de caracterización estructural mencionado en el apartado 1.3.3 ha permitido hasta el momento la identificación de 3 sitios adecuados para la inserción de secuencias heterólogas en la

proteína de la cápsida de RHDV (Figura 1.6): (i) el extremo N-terminal de la proteína VP60, que se localiza en el interior de las VLPs de RHDV; (ii) un sitio localizado entre los aminoácidos en las posiciones 306 y 307 de la secuencia de la proteína VP60, ubicado en el bucle L1 perteneciente al subdominio P2, que se encuentra expuesto hacia la superficie en las VLPs de RHDV; (iii) en el extremo C-terminal de la proteína VP60, situado también hacia el exterior en las VLPs de RHDV, aunque en una posición menos expuesta que el sitio anterior (22, 50, 139).

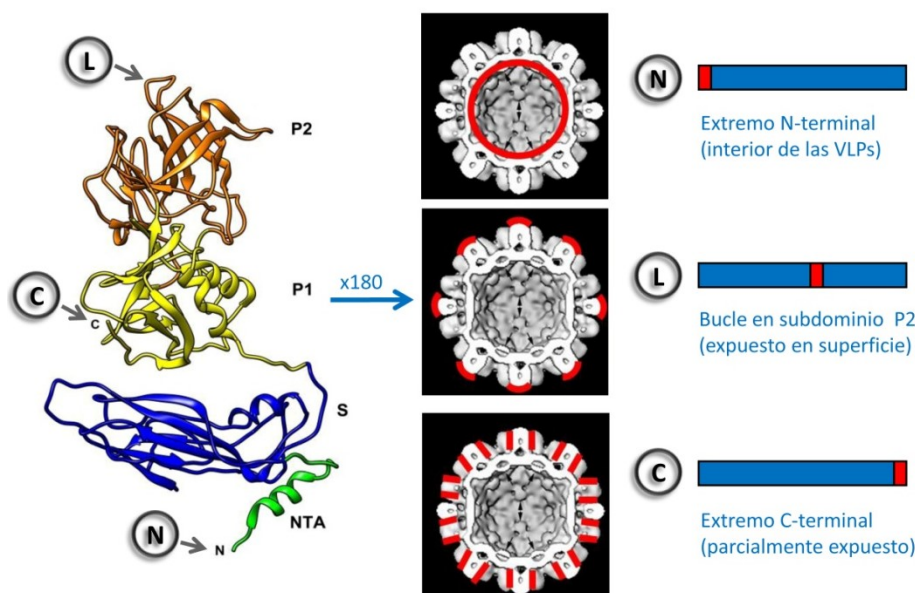


Figura 1.6. Localización de los sitios de inserción de epítopos heterólogos en la proteína VP60 de RHDV. La figura muestra un esquema de la localización de los tres sitios de inserción identificados, señalando su ubicación tanto en el modelo estructural de la proteína VP60 como en el de la cápsida viral.

En el laboratorio se han generado VLPs quiméricas derivadas de RHDV incorporando en diversas localizaciones distintos epítopos T heterólogos: el epítipo CTL (CD8+) modelo SIINFEKL, derivado de la ovoalbúmina de pollo (OVA) (199), y un epítipo T-helper (CD4+) bien caracterizado procedente de la proteína 3A del virus de la fiebre aftosa (32). Los ensayos de inmunogenicidad realizados con dichas construcciones quiméricas, confirmaron la capacidad de las VLPs de RHDV para actuar como un eficiente vector vacunal e inducir una potente respuesta inmune específica frente a los epítopos T insertados, tanto en el modelo de ratón como en el modelo porcino (50, 53, 54).

1.5. EPÍTOPOS B HETERÓLOGOS.

Una vez comprobada la efectividad de las VLPs quiméricas derivadas de RHDV para inducir respuesta inmune celular específica frente a epítopos T heterólogos insertados, en este trabajo se decidió evaluar el potencial de dichas VLPs para actuar como plataformas para la presentación multimérica de epítopos B heterólogos e inducir una potente respuesta humoral frente a ellos. Con ese objetivo, se seleccionaron dos epítopos B con características diferentes: un epítipo B neutralizante derivado de la proteína de la cápsida del virus FCV (VP1, también conocida como VP62), y la secuencia correspondiente al dominio extracelular de la proteína M2 del virus de la gripe, M2e.

El epítipo B neutralizante derivado del virus FCV (cepa Urbana) empleado en este estudio (denominado FCV22), fue identificado y caracterizado en nuestro laboratorio. Se corresponde con la secuencia de 20 aminoácidos que abarca los residuos 440-459 de la proteína VP62. Dicha secuencia se localiza en la zona apical del subdominio P2 (170), en el bucle que conecta las láminas β B' y C' (*loop B'C'*) (Figura 1.7).

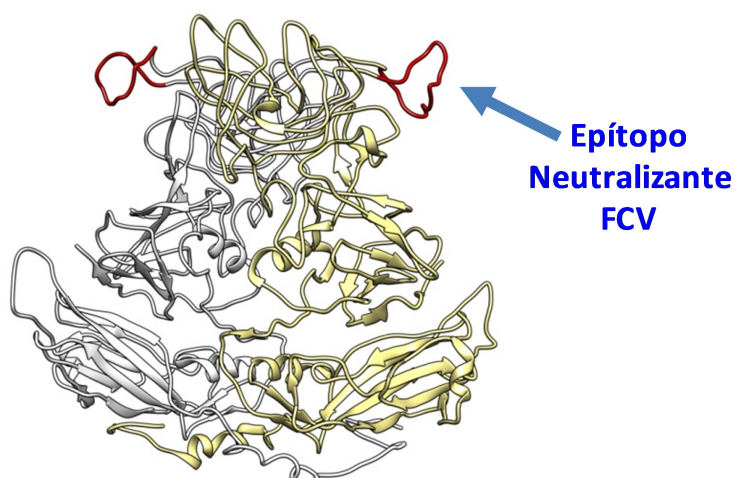


Figura 1.7. Modelo estructural de la proteína de la cápsida de FCV. Se muestra un dímero de la proteína VP62 de FCV (PDB 3M8L). En color rojo se indica la secuencia que contiene el epítipo B neutralizante FCV22 empleado en este estudio.

El epítipo se localiza dentro de una región de 35 aminoácidos (residuos 426-460) conocida como E5'HVR, que es hipervariable, contiene algunos de los principales determinantes antigénicos del virus (155, 189, 229) y está implicada en la interacción del virus con su receptor celular (30, 31, 170). En nuestro laboratorio se han obtenido anticuerpos monoclonales con actividad neutralizante que reconocen la secuencia ITTANQY (datos no publicados), contenida dentro de la secuencia abarcada por el epítipo FCV22. Esto indicaba que el epítipo FCV22 debía tener capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes frente a FCV.

El otro epítipo modelo empleado en este estudio fue una secuencia de 21 aminoácidos derivada del dominio extracelular de la proteína M2 del virus de la gripe A (cepa PR8). La proteína M2 es una proteína integral de membrana de 97 aminoácidos, que se dispone en forma de homotetrámeros y actúa como un canal iónico selectivo para protones (207) (Figura 1.8). Los 24 aminoácidos del extremo N terminal constituyen el ectodominio o dominio extracelular, M2e, de la proteína. Los residuos 25-46 forman una α -hélice que tetrameriza constituyendo el dominio transmembrana. El resto de la proteína, una α -hélice de 15 aminoácidos (residuos 47-61) y la cola C-terminal (residuos 62-97) se localiza en el citoplasma celular. La proteína M2 se encuentra presente sólo en un número reducido de copias por virión, sin embargo es relativamente abundante en la membrana de las células infectadas.

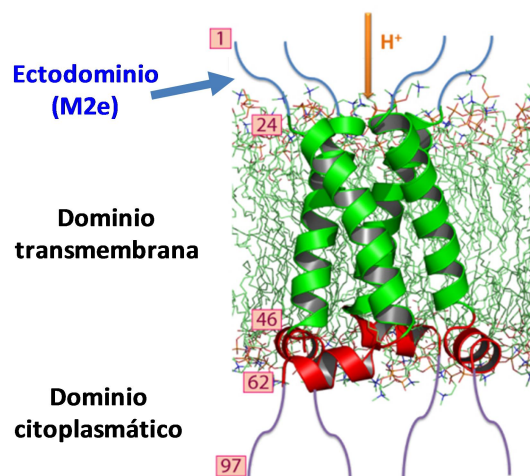


Figura 1.8. Modelo estructural de la proteína M2 del virus de la gripe (figura adaptada a partir de (207)). En la figura se señala la localización de la secuencia M2e empleada en este estudio.

La secuencia del dominio M2e está notablemente conservada entre las cepas de gripe tipo A humanas, y se ha demostrado que un péptido conteniendo dicha secuencia incorporado en la superficie de diversos sistemas de VLPs es capaz de inducir respuesta inmune protectora frente a un desafío letal en ratones, dando lugar al concepto de vacuna “universal” frente a la gripe (29, 82, 103, 163, 228). Los mecanismos inmunológicos que median la protección frente al virus de la gripe conferida por los inmunógenos basados en el dominio M2e han sido analizados en detalle (74, 101, 163, 239). Está bien establecido que dichos inmunógenos promueven una respuesta humoral protectora sin inducir neutralización de la entrada del virus en las células. Los anticuerpos anti-M2 inducidos se unen a la proteína M2 presente en la membrana de las células infectadas mediando su eliminación por parte de células NK (citotoxicidad mediada por anticuerpos, ADCC).

2. OBJETIVOS

Las VLPs de RHDV han demostrado ser un potente inmunógeno, capaz de inducir una respuesta inmune que confiere protección completa frente al virus del que proceden. Basándose en análisis estructurales y mediante técnicas de modificación genética, nuestro grupo ha generado previamente VLPs quiméricas de RHDV presentadoras de epítopos T foráneos capaces de inducir una eficaz respuesta inmune celular. En esta tesis nos hemos centrado en estudiar la capacidad de las VLPs de RHDV de inducir respuesta humoral específica y funcional frente a epítopos B heterólogos, con el fin de extender y ampliar la caracterización de estas VLPs como plataforma para el desarrollo de nuevas vacunas.

Los objetivos específicos de esta tesis han sido:

1. Diseño y obtención de construcciones quiméricas de la proteína de la cápsida de RHDV que incorporan epítopos B heterólogos en distintos sitios de inserción y con distinto número de copias por molécula. Análisis del correcto ensamblaje de dichas proteínas quiméricas en forma de VLPs.
2. Caracterización de la respuesta humoral específica inducida por las VLPs quiméricas frente a los epítopos B heterólogos incorporados.
3. Evaluación de la capacidad de las VLPs quiméricas para conferir protección frente a un desafío viral letal.
4. Identificación de regiones lineales inmunodominantes dentro del subdominio P2 de la proteína VP60 que pudieran constituir potenciales nuevos sitios de inserción de epítopos B heterólogos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES BIOLÓGICOS.

3.1.1. Animales.

Los experimentos de inmunización con VLPs quiméricas que incorporan el epítipo B derivado de la proteína de la cápsida del virus FCV se realizaron empleando ratones hembra C57BL/6 de 6-7 semanas de edad, mientras que los experimentos de inmunización con VLPs quiméricas que incorporan el ectodominio de la proteína M2 del virus de la gripe (M2e), se realizaron empleando ratones hembra de la cepa BALB/c también de 6-7 semanas de edad. Todos los ratones fueron suministrados por Harlan.

Para los ensayos de determinación de sitios inmunodominantes en el subdominio P2 de la proteína VP60 de RHDV, se obtuvieron sueros hiperinmunes en distintas especies: ratón (cepa C57BL/6), conejo (New Zealand White) y cerdo (Landrace x Large White).

3.1.2. Líneas celulares.

Para la preparación y propagación de baculovirus recombinantes, así como la expresión de las proteínas recombinantes correspondientes, se empleó la línea celular de insecto High-Five (H5) derivada de larvas de *Trichoplusia ni*, procedente del banco de células del CISA-INIA.

Para la propagación, titulación y ensayos de neutralización del virus FCV se empleó la línea celular CRFK (Crandell Rees feline kidney) derivada de células de riñón felino, suministrada por la “American Type Culture Collection” (ATCC, CCL-94).

El virus de la gripe se propagó en la línea celular MDCK derivada de epitelio renal canino, procedente del banco de células del CISA-INIA.

3.1.3. Bacterias.

Para preparar, manipular y amplificar plásmidos se utilizaron bacterias *Escherichia coli* de la cepa DH5 α .

3.1.4. Virus.

La generación de baculovirus recombinantes (*Autographa californica*, AcMNPV) se llevó a cabo empleando el sistema flashBACULTRA, de Oxford Expression Technologies ([97](#), [182](#)).

Se empleó el virus FCV de la cepa Urbana ([214](#)) (cedido por K.Y. Green, NIAID, NIH, Bethesda, Maryland, EEUU) para la realización de los ensayos de seroneutralización.

El virus de la gripe A/PuertoRico8/34 H1N1 (PR8), adaptado a ratón (cedido por A. Nieto CNB-CSIC, Madrid), se empleó en los ensayos de unión de anticuerpos anti-M2e a células MDCK infectadas, así como en los ensayos de protección de ratones frente a un desafío letal con el virus de la gripe.

3.1.5. Plásmidos.

Los rBVs se generaron a partir del vector de transferencia, pHAPhSubGB, descrito en trabajos anteriores del laboratorio (50). Brevemente, como punto de partida se empleó el plásmido pBacPAK8HA, derivado del plásmido comercial pBacPAK8 (Clontech) por eliminación de varios sitios de restricción (50). En dicho plásmido se insertó (a continuación del promotor de la poliedrina), un fragmento de DNA conteniendo la secuencia codificante de las proteínas VP60 y VP2 del virus RHDV, así como la región 3' no codificante del virus (cepa AST/89, GenBank acc. nº: Z49271), dando lugar al plásmido pHAPhSubG (50). Este plásmido fue posteriormente modificado para eliminar el sitio único de restricción BamHI presente de forma natural en el gen de la proteína VP60, sin alterar la secuencia de aminoácidos codificada por dicho gen dando lugar al plásmido pHAPhSubGB (50).

3.1.6. Péptidos sintéticos.

Para analizar los sueros de los ratones inmunizados con las distintas construcciones de VLPs quiméricas y detectar anticuerpos específicos frente a los epítomos heterólogos insertados, se realizaron ELISAs empleando péptidos sintéticos como antígenos: el péptido GSGNDITTANQYDAADIIRN (suministrado por el servicio de síntesis de péptidos de la Universidad Pompeu Fabra, Barcelona), que contiene la secuencia del epítomo B derivado de la proteína de la cápsida del virus FCV, y el péptido MSLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD (suministrado por New England Peptide), que abarca la secuencia de los 24 aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína M2 del virus de la gripe (cepa PR8), que constituyen el dominio extracelular de la proteína, M2e.

Para realizar los ensayos de identificación de regiones lineales inmunodominantes (PEPSCAN) en la secuencia del subdominio P2 de la proteína VP60 del virus RHDV, se empleó una colección de 39 péptidos sintéticos (Sigma-Aldrich, PEPscreen®). Cada péptido contenía 12 aminoácidos de la secuencia derivada de RHDV, con un solapamiento de 8 aminoácidos con el siguiente, abarcando así la secuencia completa del subdominio P2 de VP60 (aminoácidos 286-449, 164 en total). Los péptidos estaban biotinilados en el extremo N-terminal y contenían una secuencia espaciadora (SGSG) entre la biotina y la secuencia derivada de RHDV.

3.2. CULTIVOS CELULARES.

3.2.1. Mantenimiento de líneas celulares.

Las líneas celulares de mamífero (MDCK y CRFK) se cultivaron en medio DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco), suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina, 2 mM de L-glutamina y 1% de aminoácidos no esenciales, todo suministrado por Lonza. Los cultivos se incubaron a 37 °C en un ambiente con 98% de humedad y 5% de CO₂.

La línea celular de insecto H5 se cultivó a 28°C en medio TNM-FH (Sigma-Aldrich) suplementado con 5% SFB, 1% aminoácidos no esenciales, 2 mM de L-glutamina, 0.05 g/ml de gentamicina (Lonza) y 10 U/ml de nistatina (Sigma-Aldrich).

Las células se almacenaron congeladas en nitrógeno líquido en 90% SFB y 10% DMSO.

3.2.2. Propagación de virus en cultivos celulares.

El virus FCV se propagó y tituló en células CRFK según protocolos ya descritos [\(162\)](#). La propagación del virus de la gripe se llevó a cabo en células MDCK siguiendo protocolos establecidos previamente [\(21\)](#). Los rBVs generados se propagaron empleando células H5 [\(3, 22\)](#).

3.2.3. Obtención de células de pulmón murinas.

Se emplearon células pulmonares murinas en ensayos de ELISPOT para la determinación de células secretoras de anticuerpos específicas frente al epítipo M2e de gripe. Para obtener dichas células se extirparon los pulmones de ratones inmunizados y se cortaron en pequeños trozos, que se incubaron en agitación a 37°C durante 30 minutos en medio DMEM, suplementado con 5% SFB, 10 mM HEPES (Gibco), 100µg/ml de DNasa I (Roche Applied Science) y 100 U/ml de Colagenasa Tipo IV (Gibco), para facilitar la disgregación del tejido. A continuación, las preparaciones se pasaron a través de filtros de nylon de 70 µm, y el material filtrado se centrifugó a 450 g durante 5 minutos a 4°C. Tras retirar el sobrenadante, el material sedimentado se resuspendió en RPMI 1640 (Bio-Whittaker) suplementado con 2% SFB, 10 mM HEPES y 2 mM EDTA, se filtró empleando filtros de nylon de 40 µm, y se centrifugó a 450 g durante 5 minutos a 4°C. A continuación se retiró el sobrenadante y el material sedimentado se incubó durante 5 minutos con cloruro amónico estéril, con el objetivo de lisar los eritrocitos contaminantes. Finalmente, tras dos lavados con el mismo medio anterior, las células obtenidas se resuspendieron a la concentración adecuada en RPMI 1640 completo (suplementado con 20 mM

HEPES, 2 mM de L-glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina, 50 μ M β -mercaptoetanol) con 2% de SFB.

3.2.4. Obtención de esplenocitos murinos.

Para la caracterización de la respuesta celular y humoral inducida por las VLPs quiméricas que presentan el epítipo M2e de gripe, mediante ensayos de ELISPOT, se obtuvieron esplenocitos murinos. Para ello se extirparon bazo de ratones inmunizados que se recogieron en RPMI 1640 suplementado con 2% de SFB. Se sometieron a disgregación por medios mecánicos y se filtraron empleando filtros de nylon de 70 μ m. A continuación, las muestras se centrifugaron a 450 g durante 5 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante. Los eritrocitos contaminantes se eliminaron incubando 5 minutos a temperatura ambiente con cloruro amónico estéril. Tras tres lavados con RPMI 1640 con 2% de SFB, los esplenocitos se resuspendieron y se mantuvieron en medio RPMI 1640 completo suplementado con 5% de SFB.

3.2.5. Cultivo de bacterias.

Los cultivos bacterianos se realizaron en medio líquido LB (Luria-Bertani) o Terrific Broth (203). Para la preparación del medio sólido se añadió agar (15 g/l). Cuando fue necesario se añadió ampicilina (150 μ g/ml) al medio de cultivo. Para la selección de colonias bacterianas por color se utilizó Isopropyl- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, 0.1M) y 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-GAL, 20mg/ml) (Roche).

Para la transformación de bacterias electrocompetentes, las bacterias se descongelaron a 4°C y se mantuvieron a dicha temperatura. Se mezclaron 20 μ l de la suspensión de bacterias con 5 μ l del DNA a electroporar en agua desionizada. Esta mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación (Bio-Rad) de 0.2 cm fría y se aplicó un pulso en las siguientes condiciones de electroporación: 25 μ Faradios, 200 ohmios y 1.8 Kilovoltios, con una constante de tiempo de 4.5-5 milisegundos en un electroporador Bio-Rad (Gene Pulser II). Las bacterias se resuspendieron rápidamente en 1 ml de medio LB (sin antibiótico), se incubaron durante 1 hora a 37°C y se sembraron en el medio apropiado.

3.3. TAMPONES Y MEZCLAS DE REACCIÓN.

A lo largo de este trabajo se emplearon los siguientes tampones y mezclas de reacción:

- TAE: 90 mM Tris-base pH 8, 89 mM ácido acético, 2 mM EDTA.
- TBS: 25 mM Trizma Base Y 150 mM NaCl, pH 7,2.

- PBS: 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 y 8.1 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4.
- PBS-V: 176 mM NaH_2PO_4 , 24 mM Na_2HPO_4 y 0.1M NaCl, pH 6,0
- Tampón de disociación 5% (v/v) β -mercaptoetanol, 2% (p/v) dodecil sulfato sódico (SDS), 10% (v/v) glicerol, 80 mM Tris-HCl (pH 6.8) y 0.01% (p/v) azul de bromofenol.
- Solución de transferencia: 25 mM Tris, 192 mM glicina y 10% de metanol en agua.
- Tampón carbonato/bicarbonato: 15 mM CO_3Na_2 y 35 mM CO_3HNa , pH 9,6.
- Tampón citrato-fosfato: 25 mM $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ y 50 mM Na_2HPO_4 , pH 5,0.
- Solución de lisis: 0.83 % NH_4Cl .
- Solución conteo células viables: 0,4% Trypan Blue.

3.4. GENERACIÓN DE VECTORES DE TRANSFERENCIA DE BACULOVIRUS.

Como se señaló en el apartado 3.1.5, el vector de transferencia empleado para la generación de los rBVs que expresan las distintas construcciones de la proteína VP60 utilizados en este trabajo fue el plásmido pHAPhSubGB. Con el fin de facilitar la inserción de secuencias heterólogas en distintas localizaciones dentro del gen de la proteína VP60, se incorporó un sitio único de restricción BamHI, mediante mutagénesis dirigida, en las regiones correspondientes a las posiciones de los aminoácidos: 2 y 3 de la proteína (extremo N-terminal), 306 y 307 (bucle expuesto L1 dentro del subdominio P2), y posición 580 justo delante del codón de terminación de VP60 (extremo C-terminal), generando así los vectores de transferencia: pHAPh2GS, pHAPh306GS y pHAPh580GS, respectivamente.

El siguiente paso consistió en la inserción de las secuencias heterólogas de interés en cada una de las tres localizaciones seleccionadas del gen de la proteína VP60, y en diferente número de copias por sitio de inserción. Para ello se generaron fragmentos de DNA mediante hibridación *in vitro* de parejas de oligonucleótidos sintéticos fosforilados, que dejaban extremos cohesivos BamHI (Tabla 3.1). La pareja de oligonucleótidos NeuFCV22F/NeuFCV22R, que codifica la secuencia de 22 aminoácidos (FCV22): GSGNDITTANQYDAADIIRNGS, correspondiente al epítipo B neutralizante del virus FCV (cepa Urbana) flanqueado por los aminoácidos GS; y la pareja de oligonucleótidos sM2F/sM2R, que codifica la secuencia de 22 aminoácidos: GSSLTEVETPIRNEWGCRCNGS y contiene prácticamente todo el ectodominio de la proteína M2 de la cepa PR8 del virus de la gripe (21 de los 24 aminoácidos de M2e). Los fragmentos de DNA resultantes se ligaron a los plásmidos pHAPh2GS, pHAPh306GS y pHAPh580GS, previamente digeridos con BamHI. Tras las reacciones de ligación y la transformación de bacterias competentes, se analizaron por PCR grupos de las colonias de bacterias resultantes, para

identificar plásmidos que contuviesen una, dos o tres copias en tándem del inserto empleado en cada caso, en la orientación correcta. En todos los casos la secuencia insertada se verificó mediante secuenciación.

Tabla 3.1. Oligonucleótidos empleados para insertar secuencias heterólogas en los sitios de inserción seleccionados dentro del gen de la proteína VP60 de RHDV.

Nombre	Secuencia (5'→3')
NeuFCV22F	GATCTGGTAATGACATTACCACGGCTAATCAGTATGATGCAGCTGACATAATTAGAAACG
NeuFCV22R	GATCCGTTTCTAATTATGTCAGCTGCATCATACTGATTAGCCGTGGTAATGTCATTACCA
sM2F	GATCCCTTCTAACCGAGGTCGAAACGCCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACG
sM2R	GATCCGTTGCATCTGCACCCCCATTCGTTTCTGATAGGCGTTTCGACCTCGGTTAGAAGG

3.5. OBTENCIÓN DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES.

Todos los rBVs se obtuvieron empleando el sistema de expresión flashBACULTRA (Oxford Expression Technologies). Se cotransfectaron monocapas de células H5 con el DNA genómico de baculovirus flashBACULTRA y los correspondientes vectores de transferencia, empleando lipofectamina (Invitrogen). El procedimiento de obtención de rBVs se completó siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y PURIFICACIÓN DE VLPs.

El análisis de la expresión de las distintas construcciones basadas en la proteína VP60 de RHDV se realizó empleando cultivos de células de insecto H5 infectados con los rBVs correspondientes, tal como se describió previamente (3, 22).

Para la obtención de preparaciones de VLPs purificadas se infectaron monocapas de células H5 a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 con cada baculovirus recombinante. Tras incubar durante 4 días a 28°C, las células infectadas se desprendieron y se recogieron junto con el medio de cultivo. Las suspensiones resultantes se lavaron 3 veces con PBS-V (apartado 3.3) con el fin de separar las células intactas del medio de cultivo. Las células sedimentadas se resuspendieron en agua destilada con inhibidor de proteasas (Complete, Roche), se sometieron a sonicación y se trataron con DNAasa I (Roche Applied Science) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se ajustaron a 2% Sarkosyl (sodium N-lauroylsarcosine, Sigma), 5 mM EDTA en PBS-V, y se incubaron durante 16 horas a 4°C. Posteriormente, los lisados celulares se clarificaron mediante centrifugación a baja velocidad, y los sobrenadantes resultantes se

centrifugaron a 27.000 rpm durante 2 horas, empleando un rotor Beckman SW28. El material sedimentado se resuspendió en PBS-V, se sometió a 3 extracciones con Vertrel XF (Fluka, Sigma-Aldrich), y se centrifugó nuevamente a 27.000 rpm durante 2 horas empleando un rotor Beckman SW28. Finalmente, el material sedimentado se resuspendió en PBS-V con inhibidor de proteasas y las preparaciones resultantes se mantuvieron a 4 °C. Las preparaciones fueron posteriormente analizadas por SDS-PAGE y por tinción negativa en el microscopio electrónico para verificar la integridad de las VLPs. La determinación de la concentración de proteínas se realizó utilizando el ensayo de proteínas BCA (Pierce), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, empleando concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina como patrón de referencia.

3.7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS EN GELES SDS-PAGE Y WESTERN BLOT.

Las muestras se hirvieron durante 10 minutos en tampón de disociación. A continuación se resolvieron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de 10% poliacrilamida (SDS-PAGE) que se tiñeron con azul de Coomassie.

Para los ensayos de Western Blot (WB), las proteínas sometidas a SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore) empleando el sistema de transferencia húmeda Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad). Una vez transferidas, las membranas se saturaron con PBS suplementado con 5% (p/v) leche desnatada durante 16 h a 4 °C. A continuación, las membranas se incubaron durante 1 hora, bien con sueros de conejo hiperinmune, para detectar la proteína VP60 de RHDV (20), o bien con anticuerpos monoclonales específicos frente a los epítomos heterólogos insertados en las VLPs. Después de varios lavados con PBS-0.05% tween-20, las membranas se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa correspondiente, para detectar IgGs de conejo o ratón (Pierce o Invitrogen, respectivamente). Seguidamente, tras varios lavados, las membranas se revelaron con el sustrato de la peroxidasa (0.05% 4-cloro-1-naftol, 0.08% H₂O₂ (30%), 20% metanol en PBS).

3.8. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Las muestras (aproximadamente 5 µl) se aplicaron sobre rejillas de microscopía electrónica con carbón-colodión previamente ionizadas mediante descarga iónica (K100X, Emitech). Se incubaron 3 min, se lavaron 2 veces en agua y el exceso de líquido se eliminó mediante contacto del borde de la rejilla con papel de filtro grado 1 (Whatman). La concentración óptima de los diferentes ensamblados virales analizados se determinó empíricamente mediante diluciones seriadas. Las rejillas se incubaron sobre 5 µl de acetato de uranilo al 2% (p/v) durante 1 min. Para la

visualización de la muestra se empleó un microscopio electrónico JEOL 12000 EXII (CNB-CSIC) estabilizado a 100 kV, y se tomaron imágenes en micrografías electrónicas (Kodak SO-163) a una magnificación nominal de 40,000x.

3.9. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.

El diseño experimental y el mantenimiento de los animales se realizaron de acuerdo con las directrices nacionales y las establecidas por la Unión Europea sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Asimismo, los procedimientos de experimentación animal utilizados en esta tesis fueron autorizados por los Comités de Ética (CEEA 2013/009) y Bioseguridad del INIA (CBS 2013/006), con referencia PROEX 47/13.

3.9.1. Inmunización.

- Ratones.

Para los experimentos de inmunización se emplearon grupos de 5 ratones hembra de 6-7 semanas de edad de la cepa C57/BL6 o BALB/c (inmunización con VLPs quiméricas que incorporan el epítipo B de FCV o el epítipo M2e del virus de la gripe respectivamente). Los ratones fueron inmunizados por vía intraperitoneal con dos dosis de 100 µg de las VLPs correspondientes en 100 µl de PBS-V y emulsionadas con un volumen igual de adyuvante Montanide ISA 50V2 (SEPPIC), con un intervalo de 21 días entre inmunizaciones. Como control negativo se incluyó un grupo al que se inoculó PBS-V y adyuvante en las mismas condiciones.

Transcurridos 14 días tras la inoculación de la última dosis (día 35), se tomaron muestras de sangre de la vena mandibular y los animales fueron sacrificados.

Para los análisis de determinación de sitios inmunodominantes en el subdominio P2 de la proteína VP60 (PEPSCAN), se obtuvieron sueros de 8 ratones (cepa BALB/c) previamente inmunizados por vía subcutánea dorsal con VLPs de RHDV, siguiendo el protocolo de inmunización descrito anteriormente.

- Conejos.

Para los ensayos de PEPSCAN se obtuvieron sueros hiperinmunes de 4 conejos hembra de 10 semanas de edad de la raza New Zealand White. Los animales fueron inmunizados por vía intramuscular con VLPs de RHDV a días 0, 23 y 46. La dosis empleada fue 400 µg de VLPs en 500 µl de PBS-V, emulsionado en un volumen igual de adyuvante de Freund completo en la primera inmunización, e incompleto en las dos siguientes. Transcurridas dos semanas desde la última

inmunización (día 60), se obtuvo sangre de la vena marginal de la oreja y los animales fueron sacrificados.

- Cerdos.

Los sueros hiperinmunes de cerdo para los ensayos de PEPSCAN se obtuvieron mediante la inmunización de 4 machos Landrace x Large White de 6-7 semanas de edad. Cada cerdo fue inmunizado vía intramuscular con dos dosis (días 0 y 14) de 180 µg de VLPs de RHDV en 500 µl de PBS-V y emulsionadas con un volumen igual de adyuvante Montanide ISA 206 (SEPPIC). Se obtuvieron muestras de sangre de la vena cava transcurridos 14 días desde la segunda inmunización (día 28).

3.9.2. Experimentos de desafío de ratones con el virus de la gripe.

Con el fin de evaluar la protección inducida en ratones por VLPs quiméricas que incorporaban el epítipo M2e, se siguió un protocolo de inmunización similar al descrito anteriormente (apartado 3.9.1). Se llevaron a cabo dos experimentos independientes, en los cuales grupos de 14 ratones hembra de la cepa BALB/c fueron inmunizados por vía subcutánea dorsal a día 0 y día 21 con 100 µg de las VLPs correspondientes en 100 µl de PBS-V y emulsionadas en un volumen igual de adyuvante Montanide ISA 50V2. Como control negativo se inmunizó un grupo adicional con PBS-V y adyuvante. Transcurridos 14 días desde la última dosis de inmunización (día 35), 5 ratones de cada grupo fueron sacrificados para obtención de muestras, mientras que el resto de los animales se pesaron para establecer el peso inicial de cada individuo y se les extrajo suero de la vena submandibular. Posteriormente, los ratones se inocularon con 500 UFP (5xDL₅₀) del virus A/Puerto Rico/8/34 (PR8, H1N1) en 40 µl de PBS estéril, por vía intranasal. Se realizó un seguimiento diario del peso de los ratones durante los 14 días siguientes. Finalmente, los animales fueron sacrificados cuando su peso fue inferior al 75% de su peso inicial, o bien al finalizar el periodo de monitorización (día 49).

3.10. ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE.

3.10.1. ELISAs para la determinación de títulos de anticuerpos en ratones inmunizados.

La determinación de anticuerpos específicos frente a las VLPs de RHDV presentes en los sueros de los ratones inmunizados se llevó a cabo mediante ensayos de ELISA. Para ello, placas de 96 pocillos Polysorp (Nunc) tapizadas con 300 ng/pocillo de VLPs de RHDV purificadas y diluidas en tampón carbonato/bicarbonato, se incubaron durante 16h a 4°C. Las placas se bloquearon con PBS suplementado con un 5% (p/v) de leche desnatada y 0.01% Tween-20 (PTL) durante 2 horas a

37°C. A continuación se añadieron diluciones seriadas (factor de dilución 3) de los sueros en tampón PTL, que se incubaron durante 2 horas a 37°C. En cada placa se añadieron dos muestras control también en diluciones seriadas: un anticuerpo monoclonal específico frente a la proteína VP60 obtenido en nuestro laboratorio, y una muestra de suero control negativo. Cada muestra de suero (diluciones seriadas) se analizó también en paralelo en pocillos sin antígeno, con el fin de determinar la reactividad de fondo. Tras 3 lavados con PBS 0.05% Tween-20 (PT), las placas se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra específico para IgG de ratón marcado con HRPO (Invitrogen) en dilución 1:3000 en PTL, durante 45 minutos a 37°C. Finalmente, las placas se lavaron 4 veces con tampón PT y se revelaron con el sustrato de la peroxidasa (4 mg/ml *o*-fenilendiamina, 0.08% H₂O₂ [30%] solubilizado en tampón citrato-fosfato 0.05M a pH 5.0). La reacción se detuvo añadiendo H₂SO₄ 3N transcurridos 30 minutos en oscuridad y a continuación se determinó la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 492 nm.

En el caso de los ensayos de ELISA para la determinación de anticuerpos específicos frente a los epítomos heterólogos presentados por las VLPs quiméricas, se utilizaron como antígenos los péptidos sintéticos descritos en el apartado 3.1.6. Los ELISAS se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos EIA/RIA High Bind (Corning) tapizadas con 1 µg/pocillo de péptido. El protocolo de los ensayos fue similar al descrito en el párrafo anterior, con la excepción de que las placas se revelaron con Tetramethyl Benzidine (TMB) (Invitrogen). Transcurridos 15 minutos en oscuridad, la reacción se detuvo añadiendo H₂SO₄ 1,8N y a continuación se determinó la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm.

Los títulos de anticuerpos frente a cada antígeno se definieron como el inverso de la dilución más alta a la cual la absorbancia registrada fue igual o superior a 0.2 por encima del valor de fondo (absorbancia del pocillo correspondiente sin antígeno), de forma similar a la descrita previamente en (14, 90). Los sueros cuyo título fue inferior a 50 se consideraron negativos. Se determinó el título geométrico medio (TGM) +/- el error estándar de la media de cada grupo de ratones analizado.

3.10.2. Ensayo de seroneutralización del virus FCV.

Para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes frente a FCV en los sueros de los ratones inmunizados con VLPs quiméricas, se llevaron a cabo ensayos de reducción del número de placas. Para ello, los sueros, diluidos 1:20 en EMEM, se incubaron en placas M96 (Nunc) con 150-200 unidades formadoras de placa (UFP) del virus FCV, en un volumen total de 200 µl, durante 1 hora a 37°C. Como control se incluyeron preparaciones de virus realizadas en las mismas

condiciones en ausencia de suero (también se empleó como control negativo un suero irrelevante). A continuación, las muestras (triplicados de cada suero a ensayar) se añadieron sobre monocapas confluentes de células CRFK crecidas en M6 (Nunc), y se incubaron durante 1 hora y 30 minutos a 37°C, en un volumen final de 0,8 ml por pocillo. Posteriormente, se retiraron los inóculos y las monocapas se cubrieron añadiendo 2 ml/pocillo de medio semi-sólido (EMEM completo con 1% de agarosa de bajo punto de fusión [invitrogen]) (18). Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% CO₂, hasta que se formaron placas de lisis apreciables a simple vista (unas 24 h.p.i), y a continuación se fijaron y tiñeron empleando 10% formaldehído, 0.02% cristal violeta en PBS. El porcentaje de reducción de placas se calculó comparando el número de placas formadas en presencia de cada suero respecto a las placas contabilizadas en ausencia de suero (valores medios de los triplicados).

3.10.3. Ensayo de unión de anticuerpos a células MDCK infectadas con el virus de la gripe.

Los ensayos para determinar la capacidad de los anticuerpos presentes en el suero de los ratones inmunizados para unirse a la proteína M2 en su forma nativa tetramérica, expresada en células MDCK infectadas, se llevaron a cabo siguiendo procedimientos similares a los previamente descritos (95, 172). Monocapas (90% confluentes) de células MDCK crecidas en placas M96 (Nunc) se lavaron con DMEM suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina, 2 mM L-glutamina, 1% aminoácidos no esenciales, 25 mM HEPES, 0,2% BSA y 1 µg/ml tripsina TPCK (Sigma-Aldrich). A continuación las células se infectaron añadiendo 4x10³ UFP del virus de la gripe (A/PR8) diluido en el medio anterior (100 µl/pocillo), o bien se añadió medio sin virus como control de células sin infectar. Tras una incubación de 2 horas a 37°C se retiraron los inóculos, las células se lavaron dos veces, se añadió el medio descrito (200 µl/pocillo), y se incubaron las placas durante 16 horas a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Transcurrido este tiempo, las monocapas se lavaron con PBS, se fijaron con 10% formalina y se bloquearon con PBS 1% BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Entonces, se añadieron los sueros de los ratones inmunizados diluidos 1:200 en PBS 0,1% BSA (triplicados de cada suero) y se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las monocapas con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra específico para IgG de ratón conjugado con AP (Invitrogen) diluido 1:200 en PBS 0,1% BSA durante 90 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las placas se lavaron con PBS y se revelaron con el sustrato p-nitrophenyl phosphate (p-NPP) (Sigma-Aldrich). La reacción se detuvo añadiendo NaOH 3N tras 10-15 minutos en oscuridad y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm. El valor de absorbancia para cada suero se calculó como el promedio de los triplicados a los que se sustrajo el valor de fondo (promedio de los triplicados de las

absorbancias obtenidas en los pocillos de células MDCK no infectadas, tratados con los sueros correspondientes).

3.10.4. Ensayo de ELISPOT de células B.

La detección de células secretoras de anticuerpos (CSA) específicas frente al epítipo M2e de gripe se llevó a cabo mediante ensayos de ELISPOT utilizando como antígeno el péptido sintético que reproduce la secuencia de M2e descrito en el apartado 3.1.6. Para ello, se tapizaron placas de 96 pocillos MultiScreen (Millipore) con $1\mu\text{g}/\text{pocillo}$ de péptido diluido en PBS, que se incubaron durante 16 horas a 4°C . Tras dos lavados con RPMI 1640 completo con 10% de SFB, las placas se bloquearon con este mismo medio durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se prepararon mezclas de esplenocitos o células de pulmón de cada uno de los grupos de ratones inmunizados. Cada mezcla contenía la misma cantidad de células de cada uno de los ratones que integraban los grupos. Se añadieron 5×10^5 células/pocillo, diluidas en RPMI 1640 completo con 10% de SFB, y se incubaron durante 4h a 37°C en atmósfera de 5% CO_2 . A continuación las placas se lavaron tres veces con PBS 0.05% Tween-20 y se incubaron durante 16 horas a 4°C con anticuerpo secundario de cabra específico para IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (Invitrogen), diluido 1:500 en PBS con 10% SFB. Finalmente, tras lavar las placas 4 veces con PBS 0.05% Tween-20 y 2 veces con PBS, se detectó la presencia de CSA mediante revelado con sustrato BCIP[®]/NBT insoluble (Sigma-Aldrich). La reacción se detuvo transcurridos 5-10 minutos en oscuridad añadiendo agua desionizada. Los resultados se expresan como nº CSA/ 10^6 células (valor medio de triplicados).

3.10.5. ELISPOT IFN γ .

La cuantificación de células secretoras de IFN γ en los ratones inmunizados con las VLPs quiméricas se llevó a cabo mediante ensayos de ELISPOT, siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante del kit utilizado (BD-Biosciences). Se tapizaron placas de 96 pocillos MultiScreen (Millipore) con un anticuerpo de captura anti-IFN γ murino y posteriormente se bloquearon con medio RPMI 1640 suplementado con 10% SFB. Se prepararon mezclas (cantidades idénticas de células de cada ratón) de esplenocitos o células de pulmón de cada uno de los grupos de ratones inmunizados. Dichas células se añadieron a una concentración de 5×10^5 células/pocillo en el caso de los esplenocitos, y $1,5 \times 10^5$ células/pocillo en el caso de las células de pulmón, y a continuación se estimularon añadiendo el péptido sintético que reproduce la secuencia del epítipo M2e (apartado 3.1.6) a una concentración de $5\mu\text{M}$. Como control negativo se emplearon esplenocitos y células de pulmón incubados en ausencia del péptido. Tras 16 horas

a 37°C en atmósfera de 5% CO₂, las placas se lavaron y se incubaron con el anticuerpo de detección anti-IFN γ murino conjugado con biotina diluido 1:250 en PBS con 10% SFB durante 2 horas a temperatura ambiente. La presencia de células productoras de IFN γ fue detectada mediante revelado con el sustrato 3-Amino-9Ethylcarbazole (AEC) (Sigma-Aldrich). La reacción se detuvo añadiendo agua desionizada. Los resultados obtenidos se expresan como número de puntos coloreados /10⁶ células (valor medio de triplicados), restando los valores de fondo (número de puntos obtenidos en los pocillos con células no estimuladas con el péptido sintético).

3.11. ENSAYOS DE IDENTIFICACIÓN DE REGIONES LINEALES INMUNODOMINANTES (PEPSCAN) EN LA PROTEÍNA VP60 DE RHDV.

Para los ensayos de PEPSCAN se utilizaron placas HBC de 96 pocillos recubiertos de estreptavidina (Thermo Scientific). Tras tres lavados con tampón TBT (TBS suplementado con 0.05% Tween-20) se añadieron los péptidos sintéticos (ver apartado 3.1.6), a una concentración de 5 μ g/pocillo en tampón TBT, y las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Como control negativo se emplearon dos péptidos irrelevantes. A continuación, las placas se lavaron 3 veces con tampón TBT y se añadieron los sueros a ensayar (duplicados de cada muestra) diluidos en TBT con 3% (p/v) leche desnatada, incubándolos durante 1 hora a temperatura ambiente. Se emplearon las siguientes diluciones: 1:200 los sueros de ratón, 1:1.000 los sueros de conejo y 1:50 los sueros de cerdo. En el caso de los ensayos realizados con los sueros de cerdo, se introdujo un paso adicional de bloqueo (incubación con TBT 3% (p/v) leche desnatada y 0.2% BSA), previo a la incubación de las placas con los sueros, para disminuir los niveles de fondo del ensayo. Posteriormente, las placas se lavaron tres veces con TBT y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente en cada caso: anticuerpo de cabra conjugado con HRPO específico para IgGs de ratón (dilución 1:2.000, Invitrogen); específico para IgGs de conejo (dilución 1:3.000, Thermo Scientific); y específico para IgGs de cerdo (dilución 1:15.000, Thermo Scientific), todos ellos diluidos en tampón TBT con 3% (p/v) leche desnatada. Finalmente, las placas se lavaron 3 veces con tampón TBT y se revelaron con el sustrato TMB. La reacción se detuvo añadiendo H₂SO₄ 1,5N, transcurridos 15 minutos en oscuridad y a continuación se determinó la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm.

3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El procesamiento estadístico de los datos se llevó a cabo usando el programa GraphPad Prism 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Los títulos de anticuerpos se reportaron determinando el título geométrico medio (TGM) \pm el error estándar de la media (EEM) de cada grupo de ratones analizado. Las comparaciones entre los diferentes grupos se realizaron aplicando un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), en combinación con la prueba post-hoc para el tratamiento de datos de Tukey o de Dunnett. Esta última se empleó también para la comparación de pérdida de peso (evaluación de la morbilidad inducida por el desafío con el virus de la gripe) entre los grupos de ratones inmunizados con las VLPs quiméricas y los grupos control (inoculados con PBS ó VP60). La significación estadística de las diferencias entre grupos en las curvas de supervivencia estimadas mediante el método Kaplan-Meier, se calculó aplicando la prueba de Mantel-Cox (log-rank). Los valores P mostrados corresponden a comparaciones bilaterales, considerándose significativo $P \leq 0.05$. En las figuras, el valor p está representado como * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4. RESULTADOS

4.1. INMUNOGENICIDAD DE VLPs QUIMÉRICAS DE RHDV QUE INCORPORAN UN EPÍTOPO B NEUTRALIZANTE DE FCV.

4.1.1. Generación y caracterización de las VLPs quiméricas RHDV-FCV22.

Se generaron baculovirus recombinantes que expresaban diferentes mutantes de inserción de la proteína VP60 (Figura 4.1). La secuencia heteróloga insertada: GSGNDITTANQYDAADIIRNGS (22 aa) contenía el epítipo B, denominado FCV22, derivado de la proteína de la cápsida del virus FCV (VP62), flanqueado por los aminoácidos flexibles GS, con el fin de tratar de facilitar el acomodo del péptido insertado en la estructura de la cápsida viral. La secuencia heteróloga se incorporó en tres localizaciones distintas de la proteína VP60 y en diferente número de copias por sitio, en base a consideraciones estructurales (Figura 1.6).

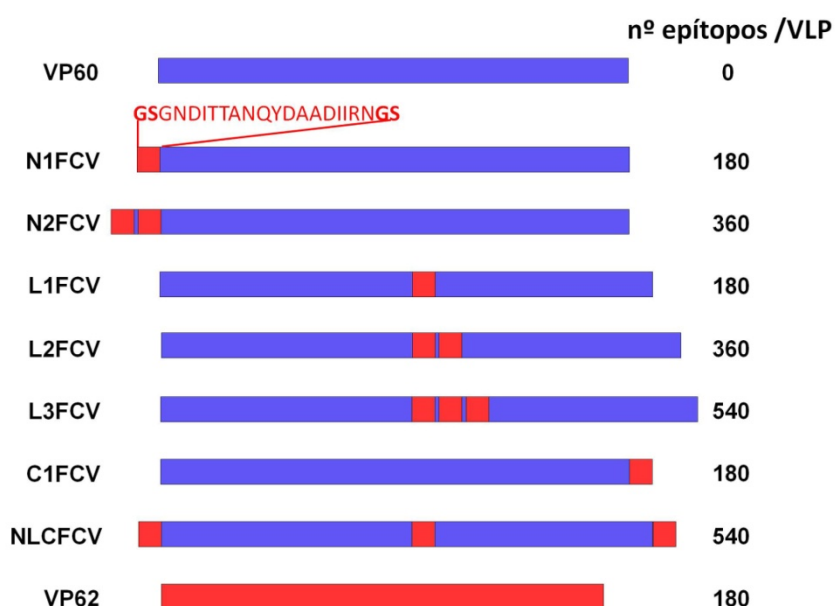


Figura 4.1. Representación esquemática de los mutantes de inserción de la proteína VP60 que incorporan el epítipo FCV22. A la izquierda se muestra el nombre de cada construcción. A la derecha se indica el número de copias del inserto FCV22 que incorpora una VLP compuesta por 180 monómeros de cada construcción. En color azul se representa la proteína VP60 (RHDV), en rojo la proteína VP62 (FCV) y como cuadrados rojos el epítipo FCV22 en los mutantes de inserción.

Se generaron mutantes de inserción que incorporaban una o dos copias del epítipo FCV22 entre los aminoácidos en las posiciones 2 y 3 de la proteína VP60 (N1FCV y N2FCV, respectivamente). De acuerdo con el modelo atómico de la proteína VP60 (240), el extremo N-terminal se localiza hacia la cara interna en la cápsida viral. Otro grupo de mutantes de inserción incorporaba 1-3 copias del epítipo FCV22 entre los aminoácidos en las posiciones 306 a 307 de la proteína VP60 (L1FCV, L2FCV and L3FCV, respectivamente). Dicho sitio de inserción se localiza en

el bucle L1, en la región apical del subdominio P2 de la proteína VP60, la zona más expuesta a la superficie de la cápsida de RHDV (140, 240). Un mutante de inserción adicional contenía el epítipo FCV22 en el extremo C-terminal de la proteína VP60 (C1FCV), que se localiza hacia la cara externa de la cápsida viral, en las depresiones en forma de copa pentaméricas y hexaméricas típicas de las cápsidas de los calicivirus que presenta el virus RHDV. La colección de mutantes de inserción se completó con una construcción (NLCFCV) que incorporaba una copia del epítipo FCV22 en cada uno de los tres sitios de inserción en la proteína VP60 empleados en este estudio. Finalmente, se generó un baculovirus recombinante que expresaba la proteína VP62 nativa, derivada del virus FCV.

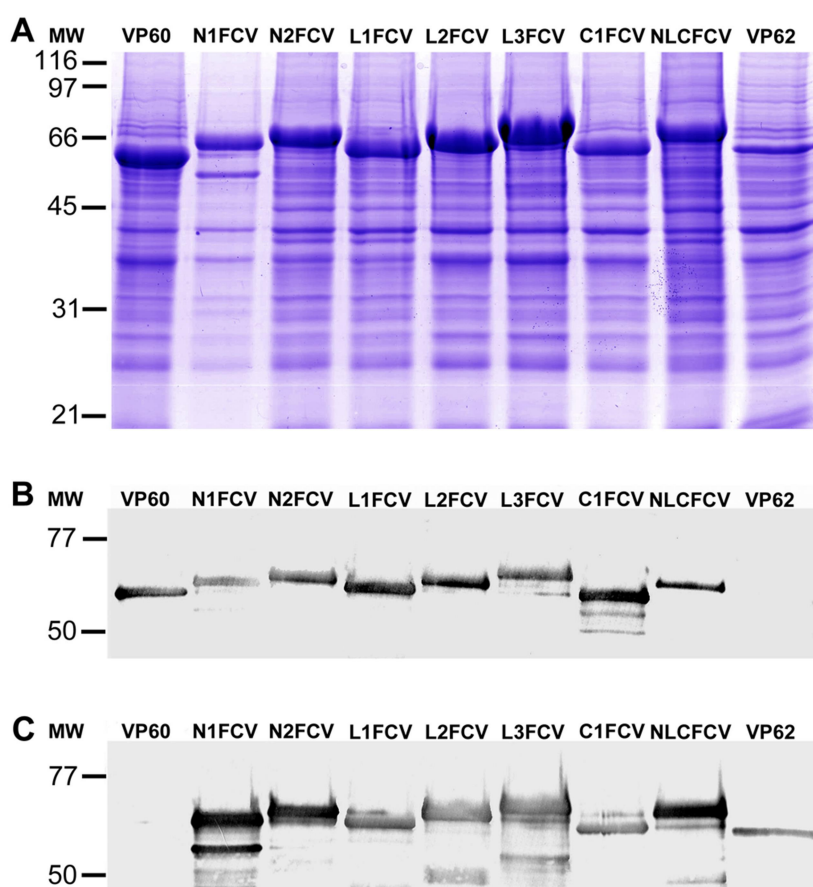


Figura 4.2. Expresión de los mutantes de inserción de la proteína VP60 que incorporan el epítipo FCV22. (A) Extractos de células de insecto H5 infectadas con los baculovirus recombinantes correspondientes se analizaron por SDS-10% PAGE. (B y C) Los extractos se analizaron por WB empleando un suero de conejo específico frente a RHDV (B) o un anticuerpo monoclonal que reconoce el epítipo FCV22 (C). A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (MW, $\times 10^{-3}$ Da).

La expresión de las proteínas recombinantes generadas se evaluó mediante SDS-PAGE y WB a partir de extractos de células H5 infectadas con los baculovirus recombinantes correspondientes (Figura 4.2). En el análisis por SDS-PAGE, el extracto correspondiente a las células infectadas con el baculovirus que expresaba la proteína VP60 nativa exhibió una proteína mayoritaria con un

peso molecular aparente de ≈ 60 kDa (Figura 4.2A), que no estaba presente en extractos de células infectadas con el baculovirus parental (*wild-type*) (datos no mostrados). Los niveles de expresión de los mutantes de inserción fueron similares a los de la proteína VP60 nativa y las bandas correspondientes exhibieron movilidades electroforéticas de acuerdo al tamaño de las secuencias incorporadas en cada construcción (el número de copias del epítipo FCV22). La proteína VP62 de FCV exhibió una movilidad electroforética compatible con el peso molecular esperado ($\approx 59,4$ kDa) y unos niveles de expresión sensiblemente más bajos que los correspondientes a las construcciones derivadas de la proteína VP60 de RHDV. En el análisis por WB, un suero de conejo específico frente a RHDV detectó a la proteína VP60, así como a los mutantes de inserción, pero no reaccionó frente a la proteína VP62 de FCV (Figura 4.2B). Por su parte, un anticuerpo monoclonal específico frente al epítipo FCV22 reconoció tanto a la proteína VP62 como a los mutantes de inserción, reflejando así la presencia del epítipo en las construcciones quiméricas, pero no reaccionó frente a la proteína VP60 (Figura 4.2C).

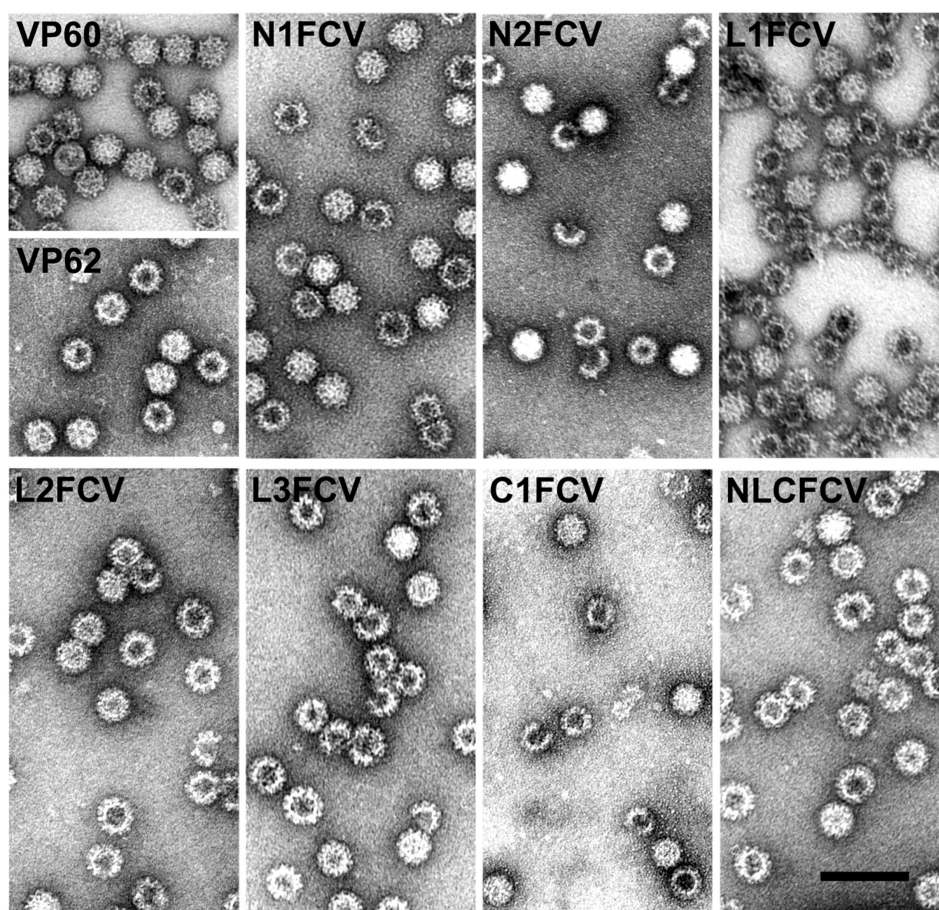


Figura 4.3. Análisis por microscopía electrónica de los mutantes de inserción de la proteína VP60 que incorporan el epítipo FCV22. Se muestra el análisis por tinción negativa de preparaciones purificadas de las proteínas recombinantes indicadas. La escala de la barra representa 100nm.

A continuación, para determinar si las nuevas construcciones quiméricas derivadas de la proteína VP60 conservaban la capacidad de ensamblarse en forma de material particulado, cultivos de células H5 infectados se sometieron a procedimientos de purificación de VLPs y las muestras resultantes se analizaron por microscopía electrónica y tinción negativa (Figura 4.3). Dicho análisis reveló que todas las construcciones quiméricas generadas se autoensamblaban dando lugar a VLPs con un diámetro aproximado de 40 nm, morfológicamente similares a las VLPs formadas por las proteínas nativas VP60 (VLPs de RHDV) y VP62 (VLPs de FCV).

4.1.2. Respuesta humoral inducida por las VLPs quiméricas RHDV-FCV22.

La respuesta humoral inducida por las VLPs quiméricas RHDV-FCV22 se evaluó en el modelo murino. Para ello, grupos de 5 ratones de la cepa C57BL/6 se inmunizaron por vía intraperitoneal dos veces con 100 µg de VLPs emulsionadas con Montanide 50V2 (Figura 4.4). Se incluyeron como controles grupos de ratones inmunizados con: VLPs de RHDV (grupo VP60), VLPs de FCV (grupo VP62) y un grupo control negativo inoculado con PBS-V y adyuvante. Dos semanas después de la segunda inmunización se tomaron muestras de sangre de todos los animales y se sacrificaron.

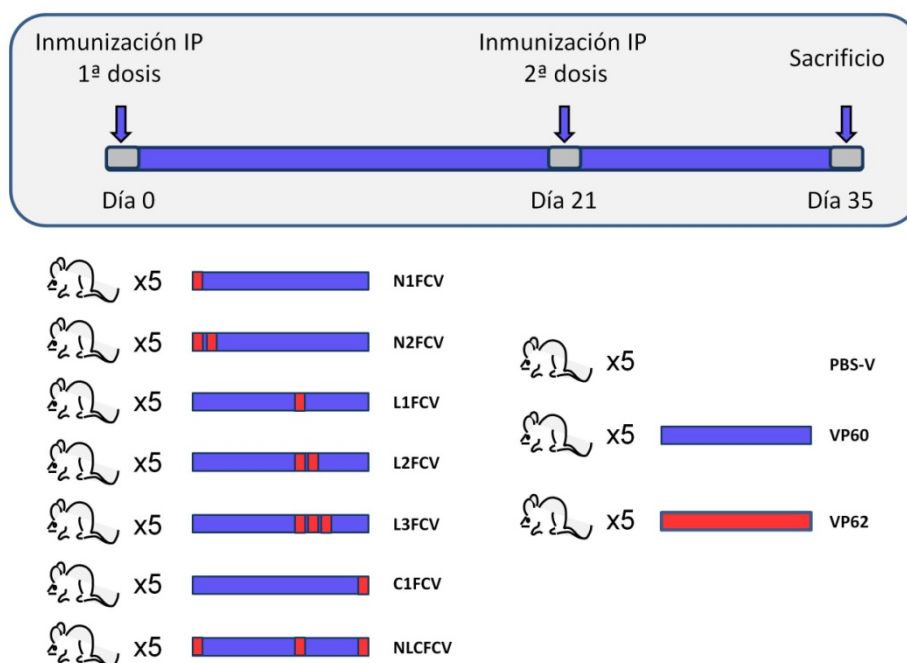


Figura 4.4. Esquema de la inmunización de ratones con las VLPs quiméricas RHDV-FCV22.

Los sueros obtenidos se analizaron por ELISA para detectar anticuerpos (IgGs) frente a la proteína VP60 (empleando VLPs de RHDV como antígeno) (Figura 4.5A) y frente al epítipo FCV22 (empleando un péptido sintético con la secuencia de dicho epítipo) (Figura 4.5B). Se determinó el título geométrico medio (TGM) de cada grupo de ratones analizado.

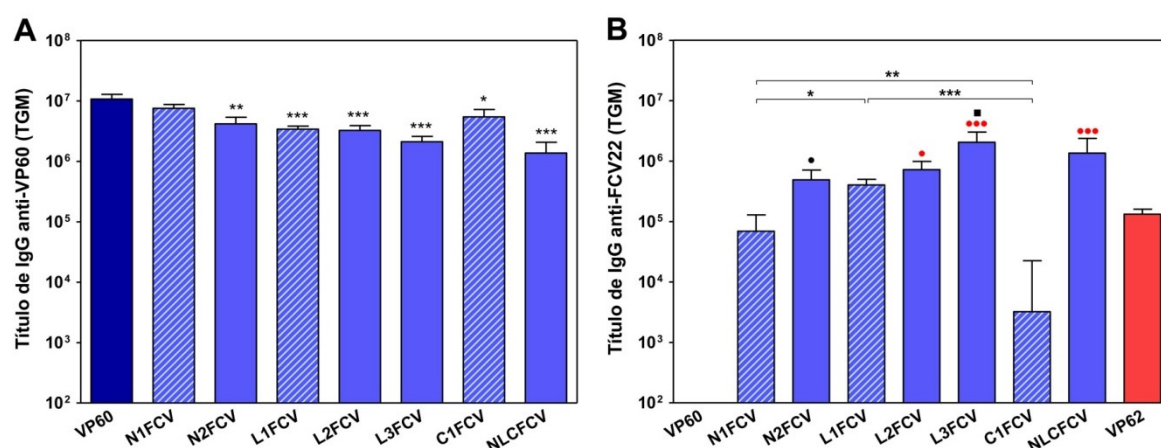


Figura 4.5. Respuesta humoral inducida por las VLPs RHDV-FCV22 en ratones. Los sueros de los grupos de ratones inmunizados se analizaron por ELISA para determinar los títulos de anticuerpos (IgGs) frente a la proteína VP60 (VLPs de RHDV) (A) y el epítipo FCV22 (péptido sintético) (B). Se representan los TGMs de cada grupo de ratones. Las barras de error indican el error estándar de la media. Los grupos inmunizados con VLPs quiméricas en los que se insertó una única copia del epítipo FCV22 por monómero (N1FCV, L1FCV y C1FCV) se muestran con barras rayadas. En (A) las diferencias de títulos de anticuerpos anti-VP60 estadísticamente significativas, con respecto a los correspondientes al grupo VP60, se muestran como: * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) y *** ($P < 0.001$). En (B) las diferencias en los títulos de anticuerpos anti-FCV22 estadísticamente significativas entre los grupos N1FCV, L1FCV y C1FCV (barras rayadas) se muestran como *; las diferencias entre los grupos que incorporan distinto número de copias del epítipo FCV22 en el extremo N-terminal se muestran como •; las diferencias entre grupos que incorporan el epítipo en el bucle L1 se muestran como ■; y las diferencias con respecto a los títulos de anticuerpos correspondientes al grupo VP62 se muestran como ●.

Todos los sueros preinmunes resultaron negativos (título < 50) para IgGs frente a los dos antígenos analizados (datos no mostrados). Los sueros de los ratones del grupo control negativo (PBS-V) también fueron negativos frente a ambos antígenos (datos no mostrados). Todos los ratones inmunizados con VLPs derivadas de RHDV (tanto las VLPs nativas como las quiméricas) desarrollaron títulos altos de anticuerpos anti-VP60 (TGMs entre $1,37 \times 10^6$ y $10,75 \times 10^6$) (Figura 4.5A). Este resultado estaba en concordancia con la elevada inmunogenicidad de la proteína VP60 y las VLPs de RHDV, previamente descrita en la literatura (34, 176, 178). Sin embargo, los resultados mostraron que la incorporación del epítipo heterólogo en las cápsidas de las VLPs quiméricas provocó disminuciones significativas en los títulos de anticuerpos anti-VP60 desarrollados por los ratones, en comparación con los títulos exhibidos por los ratones del grupo VP60. Los descensos más acusados ($P < 0.001$) se observaron en los grupos de ratones inmunizados con VLPs que incorporaban alguna copia del epítipo en el bucle L1 (L1FCV, L2FCV, L3FCV y NLCFCV).

Todos los ratones inmunizados con VLPs quiméricas incorporando el epítipo heterólogo, o con las VLPs de FCV (VP62), desarrollaron títulos de anticuerpos anti-FCV22, mientras que los sueros de los ratones inmunizados con las VLPs nativas de RHDV (VP60) resultaron negativos para dicho

antígeno (Figura 4.5B). La magnitud de la respuesta humoral anti-FCV22 difirió significativamente entre los grupos de ratones, en función tanto del sitio de inserción del epítipo heterólogo como del número de copias del epítipo presentadas por cada VLP quimérica.

En relación con el sitio de inserción (ver barras rayadas, Figura 4.5B), los resultados indicaron que la incorporación del epítipo FCV22 en cualquiera de las tres posiciones evaluadas, permite que las VLPs quiméricas induzcan anticuerpos específicos frente al epítipo heterólogo. Sin embargo, la construcción L1FCV indujo títulos de anticuerpos anti-FCV22 significativamente más elevados ($TGM = 4,04 \times 10^5$), así como una menor dispersión de los títulos de anticuerpos entre los sueros de los ratones del grupo (un error estándar de la media más reducido), que la construcción N1FCV ($TGM = 6,94 \times 10^4$; $P < 0.05$), o la construcción C1FCV ($TGM = 3,22 \times 10^3$; $P < 0.001$). Cabe destacar que el TGM inducido por la construcción L1FCV fue más de tres veces superior al inducido por las VLPs nativas de FCV (VP62) ($TGM = 1,32 \times 10^5$), si bien dicha diferencia no resultó estadísticamente significativa.

Con respecto a la influencia del número de copias del epítipo B heterólogo incorporadas por cada monómero sobre la respuesta humoral inducida frente a FCV22, los resultados indicaron que el incremento del número de copias del epítipo incorporadas lleva aparejado un incremento significativo en los títulos de anticuerpos específicos inducidos (Figura 4.5B, compárense los grupos N1FCV y N2FCV, y los grupos L1FCV, L2FCV y L3FCV). De hecho, los títulos más elevados de anticuerpos anti-FCV22 fueron inducidos por las dos construcciones que incorporaban 3 copias del epítipo heterólogo por cada monómero de VP60: L3FCV ($TGM = 2,06 \times 10^6$) y NLCFCV ($GMT = 1,36 \times 10^6$). Ambas construcciones, que incorporaban 540 copias del epítipo FCV22 por VLP, mostraron TGMs más de 3 veces superiores al TGM correspondiente a L1FCV (180 copias por VLP), y más de 10 veces superiores al TGM correspondiente a VP62 (180 copias por VLP).

4.1.3. Actividad neutralizante frente al virus FCV inducida por las VLPs quiméricas RHDV-FCV22.

El paso siguiente consistió en determinar si la respuesta de anticuerpos anti-FCV22 inducida por las VLPs quiméricas tenía actividad neutralizante frente a la infección de células felinas (CRFK) por el virus FCV. Para ello se realizaron ensayos de reducción del número de placas de lisis en presencia de sueros, siguiendo los procedimientos descritos en Materiales y Métodos (apartado 3.10.2) (Figura 4.6). Ninguno de los sueros del grupo control negativo (PBS-V) (datos no mostrados), ni los correspondientes al grupo inmunizado con las VLPs nativas de RHDV (VP60) mostró actividad neutralizante detectable frente a la infección por FCV. Todos los sueros de ratones inmunizados con VLPs quiméricas incorporando el epítipo FCV22 mostraron actividad

neutralizante significativa frente a FCV, aunque con niveles diversos (porcentajes de reducción de número de placas medios por grupo que oscilaron entre 18,64% y 98,45%). Los resultados ilustraron la capacidad del epítipo FCV22, identificado en nuestro laboratorio y empleado en este estudio, de inducir una respuesta de anticuerpos neutralizante frente a la infección por FCV, si bien no llegó a alcanzarse una neutralización completa (reducción del 100% en el número de placas) en las condiciones de ensayo empleadas. Por contraste, todos los sueros de los ratones inmunizados con las VLPs nativas de FCV alcanzaron el 100% de actividad neutralizante. Probablemente, este hecho reflejaba la capacidad de las VLPs de VP62 para inducir una respuesta neutralizante policlonal, dirigida simultáneamente frente a diversos epítipos neutralizantes presentes en la cápsida de FCV (155, 162, 191, 229), mientras que las VLPs quiméricas de RHDV sólo podían inducir anticuerpos neutralizantes anti-FCV dirigidos frente al epítipo FCV22.

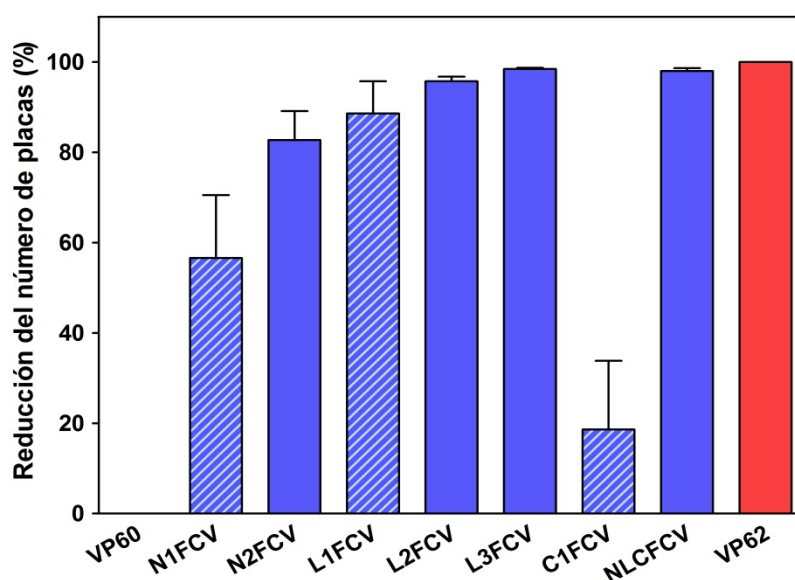


Figura 4.6. Actividad neutralizante frente al virus FCV inducida por las VLPs RHDV-FCV22 en ratones. La capacidad de las VLPs quiméricas para inducir actividad neutralizante frente al virus FCV se evaluó mediante ensayos de reducción del número de placas en presencia de los sueros. Se representa el valor medio geométrico del porcentaje de reducción de placas correspondiente a cada grupo de ratones. Las barras de error indican el error estándar de la media.

Los resultados obtenidos en relación con la influencia del sitio de inserción y del número de copias del epítipo B heterólogo incorporadas sobre la magnitud de la actividad neutralizante inducida por las VLPs quiméricas, estuvieron en concordancia con los indicados más arriba sobre respuesta humoral específica frente a FCV22 (compárense las Figuras 4.5B y 4.6). Así, la construcción L1FCV, que portaba el epítipo heterólogo en el bucle L1, indujo una mayor actividad neutralizante (88,60%) que las construcciones N1FCV (56,62%) y C1FCV (18,64%). Por otro lado, el incremento en el número de copias del epítipo B heterólogo incorporadas por monómero de

VP60 conllevó un incremento de la actividad neutralizante frente a FCV inducida por las VLPs quiméricas, de manera que los valores más altos se alcanzaron con las construcciones que incorporaban tres copias del epítipo FCV22 por monómero: L3FCV (98,45%) y NLCFCV (98%).

4.2. INMUNOGENICIDAD DE VLPs QUIMÉRICAS DE RHDV QUE INCORPORAN EL EPÍTOPO M2e DEL VIRUS DE LA GRIPE A.

Los prometedores resultados obtenidos con un epítipo B neutralizante modelo, nos llevaron a seguir explorando el potencial de las VLPs de RHDV como vector vacunal para la presentación de epítopos B, evaluando su capacidad para inducir una respuesta inmune protectora frente a un patógeno relevante en un modelo animal. A tal fin se decidió emplear un epítipo B bien caracterizado: el dominio extracelular de la proteína M2 del virus de la gripe A, M2e, que ha demostrado su capacidad de inducir protección frente a un desafío letal en el modelo de ratón, al ser presentado adecuadamente al sistema inmune (163). Las construcciones se generaron utilizando como base el virus de la gripe A/PR8/8/34 (H1N1), una cepa vacunal adaptada a ratón y ampliamente utilizada como modelo en estudios de desafío viral de ratones.

4.2.1. Generación y caracterización de las VLPs quiméricas RHDV-M2e.

Siguiendo la misma aproximación descrita más arriba se generó una nueva colección de baculovirus recombinantes que expresaban mutantes de inserción de la proteína VP60 (Figura 4.7). La secuencia: GSSLTEVETPIRNEWGCRCNGS (22 aa), conteniendo el epítipo M2e flanqueado por los aminoácidos flexibles GS, se incorporó en los tres sitios de inserción descritos dentro de la proteína VP60, dando lugar a las construcciones: NM2e, LM2e y CM2e.



Figura 4.7. Representación esquemática de los mutantes de inserción de la proteína VP60 que incorporan el epítipo M2e. A la izquierda se muestra el nombre de cada construcción. A la derecha se indica el número de copias del inserto M2e que incorpora una VLP compuesta por 180 monómeros de cada construcción. En color azul se representa la proteína VP60 y como cuadrados verdes el epítipo M2e.

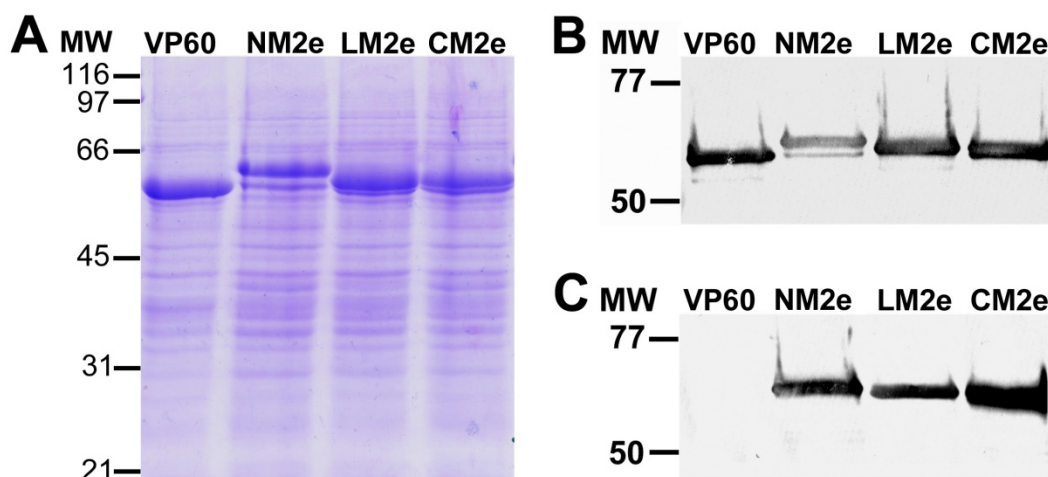


Figura 4.8. Expresión de los mutantes de inserción de la proteína VP60 que incorporan el epítipo M2e. (A) Extractos de células de insecto H5 infectadas con los baculovirus recombinantes correspondientes se analizaron por SDS-10% PAGE. (B y C) Los extractos se analizaron por WB empleando un suero de conejo específico frente a RHDV (B) o el anticuerpo monoclonal 14C2 que reconoce al epítipo M2e (C). A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (MW, $\times 10^{-3}$ Da).

A continuación se analizó la expresión de las nuevas construcciones. Para ello, extractos de células H5 infectadas con los baculovirus recombinantes correspondientes se sometieron a SDS-PAGE y WB (Figura 4.8). Los niveles de expresión de los tres mutantes de inserción fueron comparables a los correspondientes a la proteína VP60 y sus movilidades electroforéticas compatibles con la incorporación del epítipo heterólogo (Figura 4.8A). En el análisis por WB, el suero de conejo específico frente a RHDV detectó a la proteína VP60, así como a los mutantes de inserción (Figura 4.8B). Por su parte, un anticuerpo monoclonal comercial (14C2) específico frente al epítipo M2e reconoció las construcciones quiméricas, pero no reaccionó frente a la proteína VP60 (Figura 4.8C).

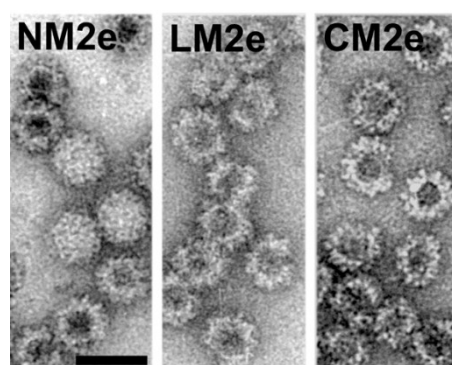


Figura 4.9. Análisis por microscopía electrónica de los mutantes de inserción de la proteína VP60 que incorporan el epítipo M2e. Se muestra el análisis por tinción negativa de preparaciones purificadas de las proteínas recombinantes indicadas. La escala de la barra representa 100nm.

El correcto autoensamblaje de las construcciones quiméricas generadas se analizó por microscopía electrónica y tinción negativa. Como muestra la **Figura 4.9**, las tres construcciones analizadas dieron lugar a VLPs con tamaño y morfología similares a las correspondientes a proteína VP60 nativa.

4.2.2. Respuesta humoral inducida por las VLPs quiméricas RHDV-M2e.

La respuesta humoral inducida por las VLPs quiméricas RHDV-M2e se evaluó en el modelo murino. Para ello, grupos de 5 ratones de la cepa BALB/c se inmunizaron por vía intraperitoneal dos veces con 100 µg de VLPs emulsionadas con Montanide 50V2 (**Figura 4.10**). Se incluyeron como controles grupos de ratones inmunizados con VLPs de RHDV (grupo VP60) y un grupo control negativo inoculado con PBS-V y adyuvante. Dos semanas después de la segunda inmunización se tomaron muestras de sangre de todos los animales y se sacrificaron.

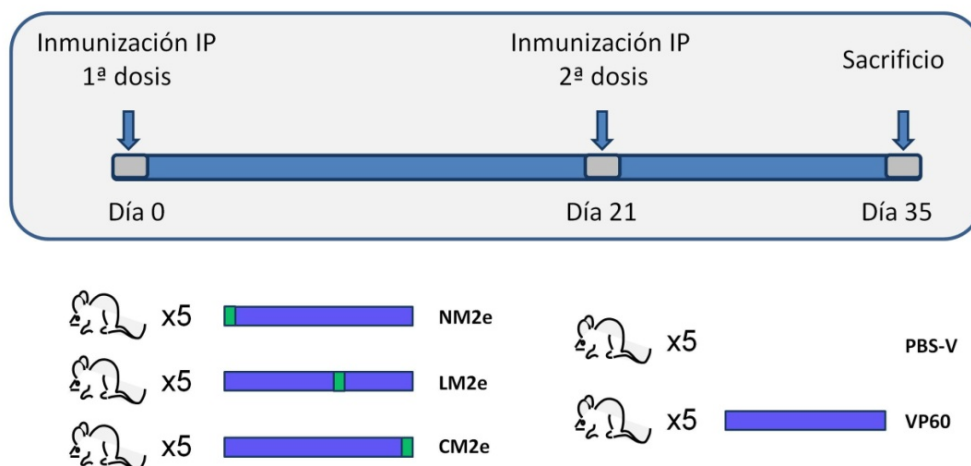


Figura 4.10. Esquema de la inmunización de ratones con las VLPs quiméricas RHDV-M2e.

Los sueros obtenidos se analizaron por ELISA para detectar anticuerpos (IgGs) frente a la proteína VP60 (empleando VLPs de RHDV como antígeno) (**Figura 4.11A**) y frente al epítipo M2e (empleando un péptido sintético con la secuencia de dicho epítipo) (**Figura 4.11B**). Se determinó el título geométrico medio (TGM) de cada grupo de ratones analizado. Todos los sueros preinmunes resultaron negativos (título < 50) para IgGs frente a los dos antígenos analizados (datos no mostrados). Los sueros de los ratones del grupo control negativo (PBS-V) también fueron negativos frente a ambos antígenos (datos no mostrados). Todos los ratones inmunizados con VLPs derivadas de RHDV (tanto las VLPs nativas como las quiméricas), desarrollaron títulos altos de anticuerpos anti-VP60 (TGMs entre $8,73 \times 10^5$ y $3,83 \times 10^6$) (**Figura 4.11A**). Tal como ocurrió en el caso anterior con las VLP RHDV-FCV22, la construcción quimérica que incorporaba el

epítipo heterólogo en el bucle L1 de la proteína VP60 (LM2e), indujo títulos de anticuerpos anti-VP60 significativamente menores ($P < 0.001$) a los inducidos por los ratones del grupo VP60.

Por otra parte, todos los ratones inmunizados con VLPs quiméricas incorporando el epítipo heterólogo desarrollaron títulos de anticuerpos anti-M2e, mientras que los sueros de los ratones inmunizados con las VLPs nativas de RHDV (VP60) resultaron negativos para dicho antígeno (Figura 4.11B). De manera similar al caso anterior, los ratones del grupo LM2e exhibieron títulos de anticuerpos anti-M2e más elevados (TGM = $4,36 \times 10^5$) que los correspondientes a los ratones del grupo NM2e (TGM = $1,69 \times 10^5$, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa) y los ratones del grupo CM2e (TGM = $6,15 \times 10^3$; $P < 0.05$).

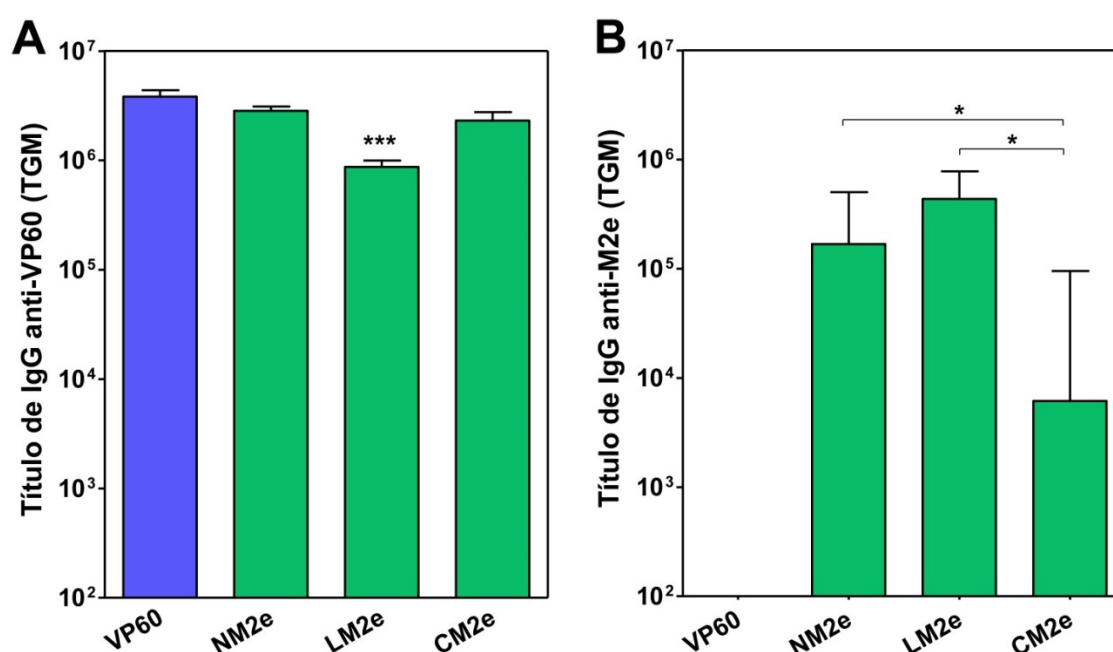


Figura 4.11. Respuesta humoral inducida por las VLPs RHDV-M2e en ratones. Los sueros de los grupos de ratones inmunizados se analizaron por ELISA para determinar los títulos de anticuerpos (IgGs) frente a la proteína VP60 (VLPs de RHDV) (A) y el epítipo M2e (péptido sintético) (B). Se representan los TGMs de cada grupo de ratones. Las barras de error indican el error estándar de la media. En (A) se indican las diferencias de títulos de anticuerpos anti-VP60 estadísticamente significativas con respecto a los correspondientes al grupo VP60. En (B) las diferencias en los títulos de anticuerpos anti-M2e entre los grupos inmunizados con VLPs quiméricas. * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) y *** ($P < 0.001$).

4.2.3. Reactividad frente a células MDCK infectadas con el virus de la gripe de los anticuerpos inducidos por las VLPs quiméricas RHDV-M2e.

Con objeto de determinar si los anticuerpos frente a M2e inducidos por las VLPs quiméricas eran capaces de reconocer dicho epítipo presentado en su forma nativa, en el contexto de la proteína M2 tetramérica expresada en la superficie de células infectadas por el virus de la gripe A,

los sueros de los ratones inmunizados con las VLPs se analizaron también mediante un ELISA basado en el empleo de células MDCK infectadas con el virus de la gripe, siguiendo procedimientos previamente descritos (95, 172) (véase apartado 3.10.3). Los resultados obtenidos (Figura 4.12) indicaron que los anticuerpos anti-M2e inducidos por las VLPs RHDV-M2e reconocieron eficientemente al epítipo en su conformación nativa en la superficie de las células MDCK infectadas. En concordancia con los resultados anteriores, los sueros pertenecientes a los ratones del grupo LM2e exhibieron una mayor reactividad en este ensayo que los correspondientes a los ratones de los grupos NM2e y CM2e.

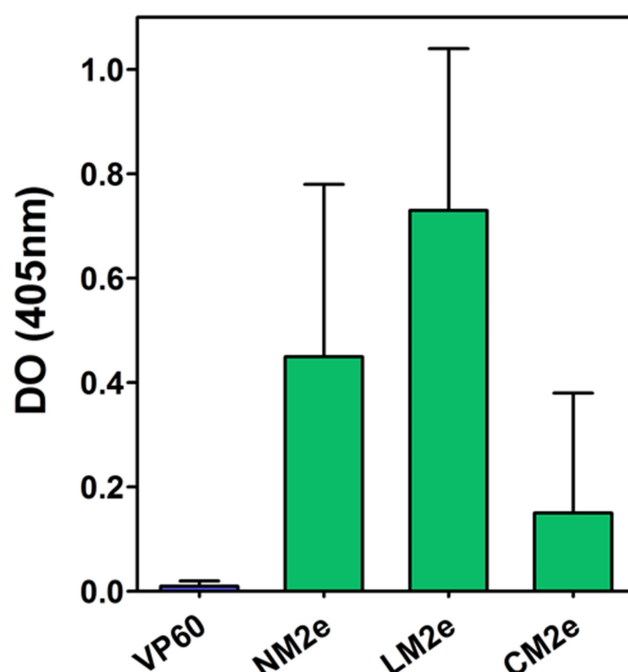


Figura 4.12. Ensayo de unión de anticuerpos a células MDCK infectadas con el virus de la gripe. Los sueros de los ratones inmunizados con las VLPs RHDV-M2e se analizaron mediante ELISA empleando células MDCK infectadas con el virus de la gripe A/PR/8. Se muestran las medias geométricas de las DO de cada grupo de ratones. Las barras de error indican el error estándar de la media.

En conjunto, los resultados obtenidos tanto con las VLPs quiméricas que incorporaban el epítipo FCV22, como con las VLPs que incorporaban el epítipo M2e, mostraron el potencial de la plataforma basada en las VLPs de RHDV para inducir una eficiente respuesta humoral frente a epítipos B heterólogos incorporados en su superficie.

4.3. PROTECCIÓN FRENTE AL VIRUS DE LA GRIPE INDUCIDA POR LAS VLPs QUIMÉRICAS RHDV-M2e EN RATÓN.

El paso siguiente consistió en evaluar la capacidad de las VLPs RHDV-M2e para inducir una respuesta inmune protectora frente a un desafío viral letal con el aislado A/PR8/34 (H1N1) en el modelo murino. Para ello, grupos de 14 ratones BALB/c se inmunizaron por vía subcutánea (ruta usualmente empleada para la administración de vacunas) dos veces con 100 µg de VLPs emulsionadas con Montanide 50V2 (Figura 4.13). Se incluyeron como controles grupos de ratones inmunizados con VLPs de RHDV (grupo VP60) y un grupo control negativo inoculado con PBS-V y adyuvante. Dos semanas después de la segunda inmunización, 5 ratones de cada grupo se sacrificaron para la obtención de células de bazo y pulmón, con el fin de determinar el número de células secretoras de anticuerpos (CSA) e IFN γ presentes en dichos órganos. Del resto de los animales se extrajo suero antes de ser inoculados por vía intranasal con 5xDL₅₀ del virus de la gripe A/PR8. Durante los 14 días posteriores a la inoculación los ratones se monitorizaron diariamente para registrar la evolución de su peso, parámetro indicativo del grado de enfermedad (morbilidad). Los animales con pesos registrados \leq al 75% del peso inicial se sacrificaron, siguiendo criterios de bienestar animal.

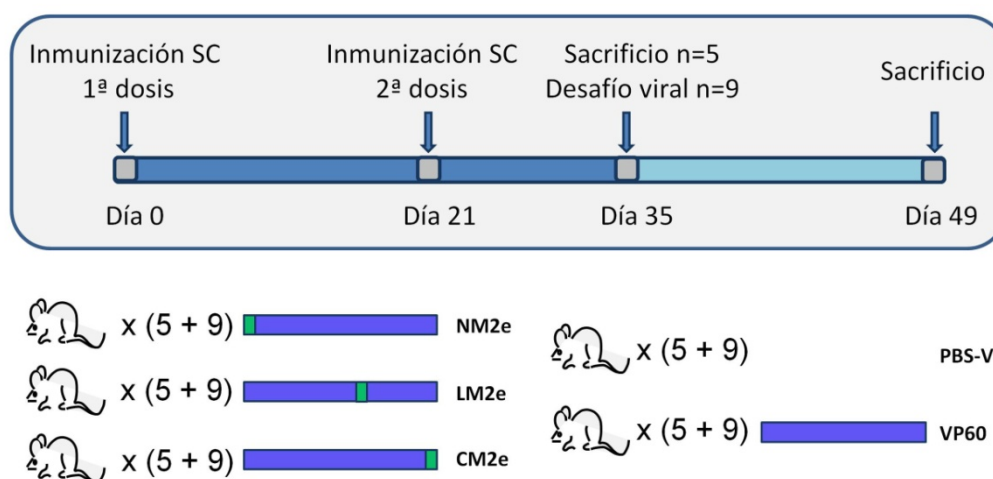


Figura 4.13. Esquema del ensayo de protección inducida por las VLPs quiméricas RHDV-M2e frente a un desafío letal con el virus de la gripe en ratones.

4.3.1. Respuesta humoral inducida (vía subcutánea) por las VLPs quiméricas RHDV-M2e.

La respuesta humoral inducida se evaluó mediante ELISA, empleando muestras de sueros recogidas a día 35 (14 días después de la segunda inmunización e inmediatamente antes del desafío viral), siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 4.2.2. La Figura 4.14

muestra los títulos de anticuerpos de los distintos grupos de ratones frente a la proteína VP60 y frente al epítipo M2e. Los resultados obtenidos fueron muy similares a los mostrados más arriba (Figura 4.11), indicando que las VLPs quiméricas RHDV-M2e inducen respuestas humores similares al ser administradas por vía intraperitoneal (Figura 4.11) o por vía subcutánea (Figura 4.14). Tanto los sueros preinmunes como los del grupo PBS-V resultaron negativos para los dos antígenos ensayados (datos no mostrados). Todos los ratones inmunizados con VLPs (tanto las nativas como las quiméricas) desarrollaron títulos elevados de anticuerpos anti-VP60 (TGMs en el rango entre $5,05 \times 10^5$ y $2,38 \times 10^6$), aunque de nuevo, los títulos inducidos por la construcción LM2e fueron significativamente más bajos que los correspondientes al grupo VP60 (Figura 4.14A)

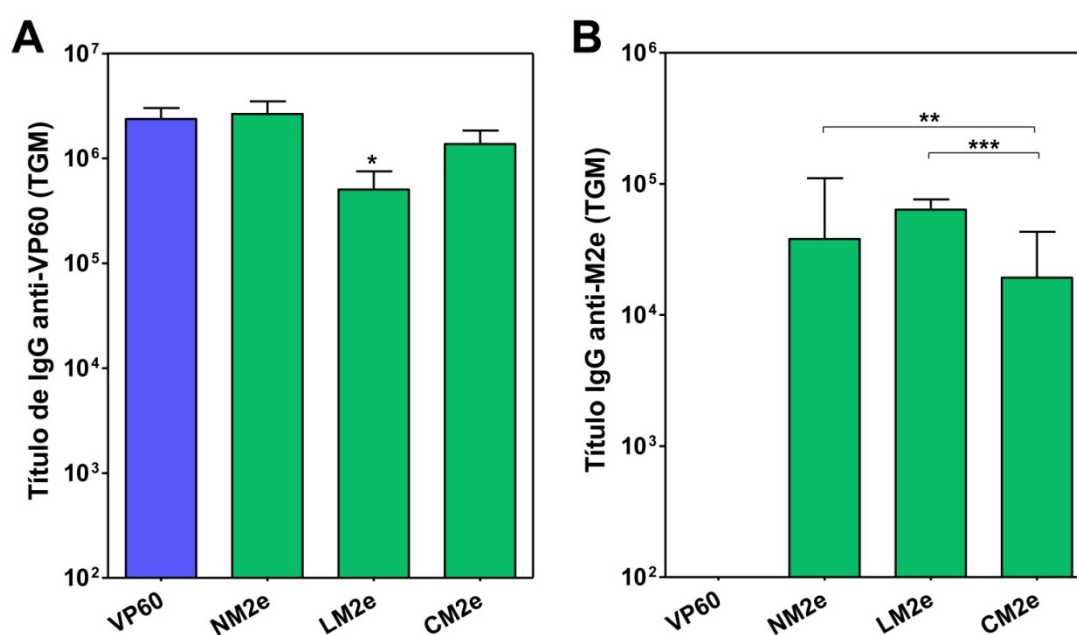


Figura 4.14. Respuesta humoral inducida por las VLPs RHDV-M2e en ratones por vía subcutánea. Los sueros de los grupos de ratones inmunizados se analizaron por ELISA para determinar los títulos de anticuerpos (IgGs) frente a la proteína VP60 (VLPs de RHDV) (A) y el epítipo M2e (péptido sintético) (B). Se representan los TGMs de cada grupo de ratones. Las barras de error indican el error estándar de la media. En (A) se indican las diferencias de títulos de anticuerpos anti-VP60 estadísticamente significativas con respecto a los correspondientes al grupo VP60. En (B) las diferencias en los títulos de anticuerpos anti-M2e entre los grupos inmunizados con VLPs quiméricas. * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) y *** ($P < 0.001$).

Todos los ratones inmunizados con VLPs quiméricas incorporando el epítipo B heterólogo desarrollaron títulos de anticuerpos anti-M2e, mientras que los ratones del grupo VP60 resultaron negativos (Figura 4.14B). En concordancia con los resultados anteriores, el grupo de ratones LM2e exhibió en conjunto niveles más altos de anticuerpos anti-M2e (TGM = $6,37 \times 10^4$), que el grupo NM2e (TGM = $3,80 \times 10^4$) y el grupo CM2e (TGM = $1,92 \times 10^4$).

Tras una inmunización, las células B específicas se diferencian en CSA que migran a través del aparato circulatorio a los tejidos. Por ello, además del título de anticuerpos específicos, la respuesta inmune humoral inducida por una vacuna puede caracterizarse determinando la frecuencia de CSA específicas frente al antígeno considerado. Para evaluar este parámetro, tras la inmunización con las VLPs RHDV-M2e, se tomaron células de bazo y pulmón de los ratones el día del sacrificio y se analizaron mediante ELISPOT (Figura 4.15), siguiendo procedimientos descritos en el apartado 3.10.4 de Materiales y Métodos. No se detectó reactividad positiva, ni con las muestras procedentes del grupo PBS-V (datos no mostrados) ni con las correspondientes al grupo VP60. En concordancia con los resultados obtenidos sobre títulos de anticuerpos específicos en suero, la inmunización con la construcción LM2e fue la que indujo una mayor frecuencia de CSA, tanto en bazo como en pulmón. Comparando las frecuencias de CSA registradas en las dos localizaciones evaluadas, estas resultaron mayores en pulmón que en bazo, en el único punto de análisis efectuado (día 35, a 14 días de la segunda inmunización).

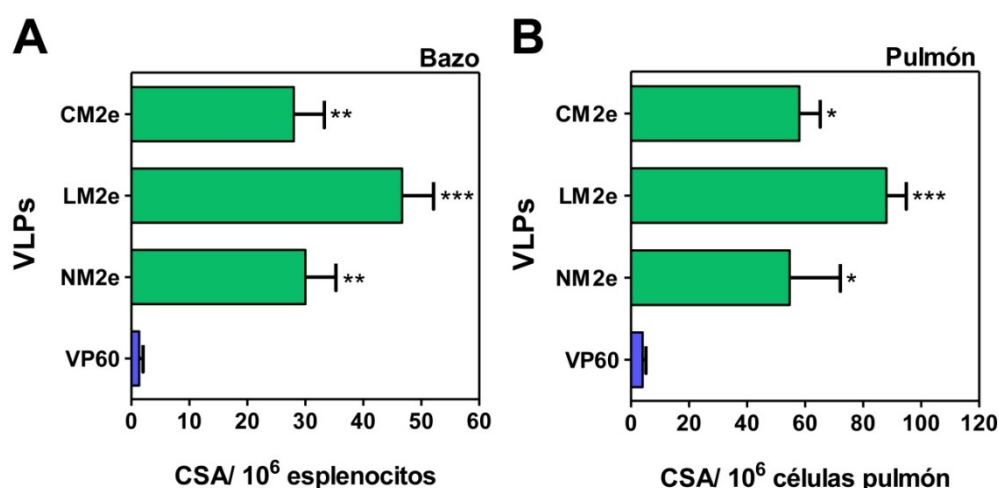


Figura 4.15. Frecuencia de CSA específicas frente al péptido M2e en bazo y pulmón. Se determinó la frecuencia de CSA específicas frente a M2e en el bazo (A) y pulmón (B) de los ratones inmunizados mediante ensayos de ELISPOT. Los ensayos se realizaron con muestras tomadas a día 35 (14 días después de la segunda inmunización). Se representan los valores medios de triplicados de un *pool* de células de los ratones de cada grupo (n=5). Las barras de error indican el error estándar de la media. En (A) y en (B) se muestran las diferencias estadísticamente significativas entre los valores correspondientes a los grupos de ratones inmunizados con VLPs quiméricas respecto a los valores del grupo VP60 * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) y *** ($P < 0.001$).

4.3.2. Respuesta celular inducida (vía subcutánea) por las VLPs quiméricas RHDV-M2e.

También se evaluaron parámetros relacionados con la inducción de respuesta inmune celular por las VLPs quiméricas RHDV-M2e. Como indicador de activación de la respuesta celular T se realizaron ensayos de ELISPOT para la determinación del número de esplenocitos secretores de

IFN γ tras su estimulación *in vitro* con el péptido M2e. La inmunización con las VLPs quiméricas RHDV-M2e indujo un número significativo de esplenocitos secretores de IFN γ en respuesta a la estimulación con el péptido M2e (Figura 4.16). Esta respuesta fue específica, ya que no se detectaron manchas en los cultivos de esplenocitos de los ratones correspondientes a los grupos PBS-V (datos no mostrados) y del grupo VP60. Los ratones del grupo LM2e exhibieron una mayor frecuencia de células secretoras de IFN γ , que los ratones correspondientes a los grupos NM2e y CM2e.

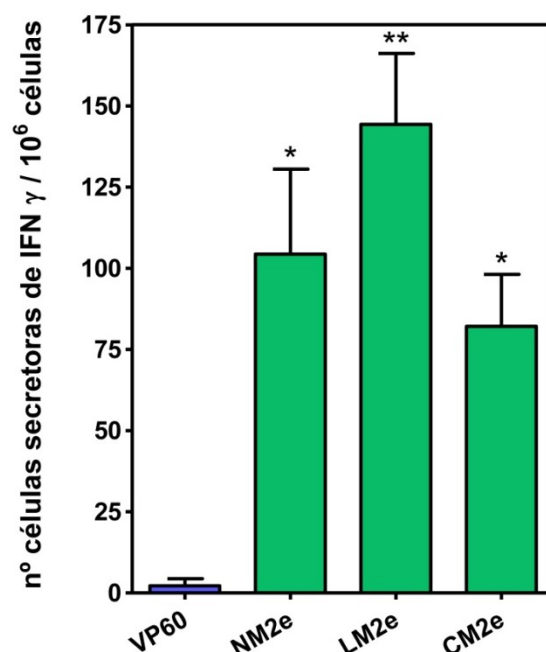


Figura 4.16. Frecuencia de células específicas secretoras de IFN γ . Se determinó el número de células secretoras de INF- γ en respuesta a la estimulación *in vitro* con el péptido M2e mediante ensayos ELISPOT empleando células de bazo. Los ensayos se realizaron con muestras tomadas a día 35 (14 días después de la segunda inmunización). Se representan los valores medios de triplicados de un *pool* de células de los ratones de cada grupo (n=5). Las barras de error indican el error estándar de la media. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas entre los valores correspondientes a los grupos de ratones inmunizados con VLPs quiméricas respecto a los valores del grupo VP60 * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) y *** ($P < 0.001$).

Los resultados evidenciaron la capacidad de las VLPs quiméricas derivadas de RHDV para inducir, además de una respuesta de anticuerpos, una respuesta celular específica frente al epítipo heterólogo incorporado, M2e, mediada por la producción de IFN γ .

4.3.3. Protección inducida por las VLPs quiméricas RHDV-M2e frente a un desafío letal con el virus de la gripe.

Para valorar la protección conferida por las VLPs quiméricas en los animales inmunizados y posteriormente desafiados con 5xDL₅₀ del virus de la gripe, se realizó un seguimiento de la

morbilidad (variaciones en el peso de los animales) y la supervivencia de los ratones durante los 14 días siguientes al desafío (Figura 4.17). Según el diseño experimental (Figura 4.13) los grupos debían estar integrados por 9 animales, pero un ratón del grupo LM2e y otro del grupo CM2e murieron antes del desafío, con lo que dichos grupos estaban integrados por 8 ratones.

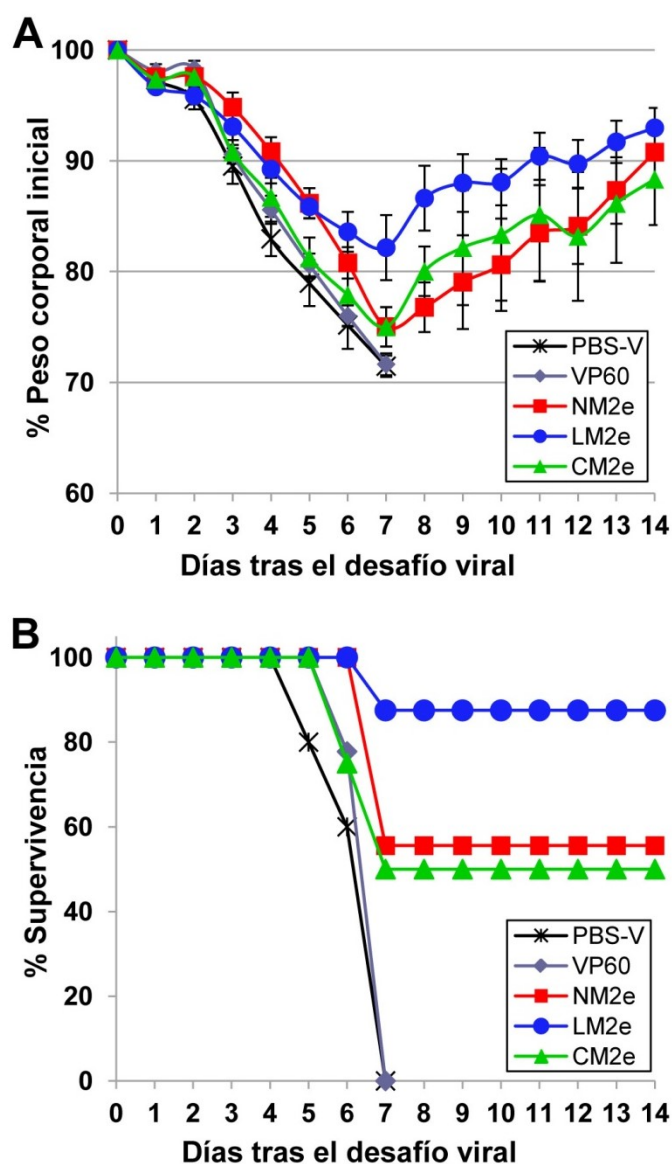


Figura 4.17. Protección de los ratones inmunizados con las VLPs RHDV-M2e frente a un desafío letal con el virus de la gripe A. Los grupos de ratones se desafiaron por vía intranasal con $5 \times LD_{50}$ del virus de la gripe (cepa A/PR/8), dos semanas después de la segunda inmunización. Durante los 14 días siguientes a la inoculación viral, los ratones se monitorizaron clínicamente a diario. (A) Evolución del peso corporal de los ratones expresado en porcentaje respecto al peso inicial. Las curvas representan el porcentaje del valor medio del peso de los ratones de cada grupo con respecto al valor del día inicial. Las barras de error indican el error estándar de la media. (B) Porcentaje de supervivencia de los animales tras el desafío viral.

Los ratones control, pertenecientes a los grupos PBS-V y VP60 experimentaron severas pérdidas de peso desde el día 3 (Figura 4.17A) y el 100% de los animales sucumbió al desafío letal

entre los días 5 y 7 (Figura 4.17B). Los ratones de los grupos NM2e y CM2e exhibieron pautas de morbilidad y supervivencia similares. El peso medio de los animales de ambos grupos sufrió una progresiva reducción hasta el día 7 tras el desafío, alcanzando porcentajes de pérdidas medias de peso del 24,97% (NM2e) y 24,99% (CM2e). A continuación, el valor medio del peso de los ratones de ambos grupos fue incrementándose gradualmente, hasta recobrar valores cercanos a los iniciales. Entre los días 6 y 7 tras el desafío, 4 de 9 ratones del grupo NM2e y 4 de 8 ratones del grupo CM2e murieron (tasa de supervivencia del 55.5% y el 50%, respectivamente). En cambio, los ratones del grupo LM2e exhibieron una menor reducción del peso medio del grupo (porcentaje de pérdida de peso medio del 17,84% el día 7), y los ratones recuperaron valores próximos a los pesos iniciales rápidamente, resultado indicativo de signos clínicos moderados. Sólo 1 de los 8 ratones del grupo sucumbió al desafío viral (tasa de supervivencia del 87,5%). Las diferencias en el porcentaje de pérdida de peso y tasa de supervivencia entre el grupo LM2e y los grupos control (PBS-V y VP60) fueron estadísticamente significativas ($P < 0.01$). En conjunto, los resultados demostraron que las VLPs quiméricas LM2e indujeron una respuesta inmune protectora en ratones frente al desafío letal con el virus de la gripe.

4.3.4. Los títulos de anticuerpos anti-M2e en suero inducidos por las VLPs de RHDV-M2e correlacionan con la protección frente al desafío letal con el virus de la gripe

Finalmente, se analizó la relación entre los títulos de anticuerpos anti-M2e inducidos por los animales inmunizados (los datos mostrados en la Figura 4.14B) y la supervivencia al desafío letal con el virus de la gripe. Los resultados se muestran en la Figura 4.18. Se pudo constatar una clara correlación entre los títulos de anticuerpos anti-M2e y la supervivencia al desafío viral. Así, todos los ratones que indujeron títulos de IgG específicas en suero ≥ 39.985 , sobrevivieron al desafío, en tanto que los ratones que desarrollaron títulos ≤ 30.161 sucumbieron (con la excepción de un ratón del grupo NM2e que sobrevivió, teniendo un título de IgG específicas de 25.812). Los resultados sugerían que un título de IgG específicas frente a M2e ≥ 39.985 podía considerarse como correlato de protección frente al desafío letal con el virus de la gripe en ratones, en las condiciones experimentales empleadas. Por otro lado, el resultado proporcionó una interpretación plausible para explicar las marcadas diferencias observadas, tanto en la morbilidad como en la tasa de supervivencia (Figura 4.17), entre los ratones del grupo LM2e y los ratones de los grupos NM2e y CM2e, a pesar de que las diferencias observadas en los TGMs anti-M2e entre los grupos (Figura 4.14B) no fueron muy elevadas. Como se muestra en la Figura 4.18, la inmunización con la construcción LM2e indujo una respuesta humoral más homogénea, con 7 de los 8 ratones (así como el TGM del grupo) mostrando niveles de anticuerpos anti-M2e superiores

al valor umbral asociado con protección. En cambio, la inmunización con las construcciones NM2e y CM2e indujeron una respuesta humoral más heterogénea, con alrededor del 50% de los animales de cada grupo (así como sus respectivos TGMs) mostrando niveles de anticuerpos anti-M2e inferiores al valor umbral asociado con protección.

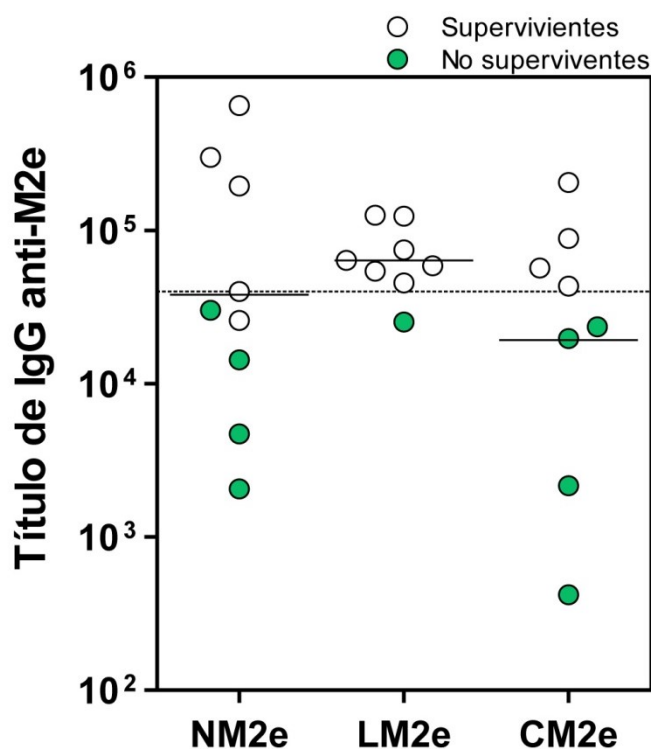


Figura 4.18. Los títulos de anticuerpos específicos anti-M2e en suero de los ratones inmunizados con las VLPs RHDV-M2e correlacionan con la protección frente al desafío letal con el virus de la gripe. Se representan los títulos de IgGs anti-M2e de cada ratón indicando en color blanco los animales que sobrevivieron al desafío y en verde los animales que sucumbieron. Las líneas continuas negras indican el TGM de cada grupo. La línea discontinua marca el valor umbral 39.000. Todos los ratones que presentaron títulos de IgG anti-M2e superiores a dicho valor umbral sobrevivieron al desafío con el virus de la gripe. Los títulos de anticuerpos anti-M2e representados en esta figura son los mismos que se mostraron previamente en la [Figura 4.14B](#).

En conjunto, estos resultados muestran que las VLPs quiméricas presentadoras del epítipo de gripe M2e son capaces de inducir una respuesta potente de anticuerpos específicos y además de activar la respuesta celular, como sugieren los resultados del ELISPOT para valorar IFN γ . Esta respuesta inmune específica y potente es además eficaz, ya que permite reducir la morbilidad de la infección con el virus de la gripe y además confiere elevados porcentajes de protección frente al desafío letal con el virus de la gripe.

4.4. IDENTIFICACIÓN DE REGIONES LINEALES INMUNODOMINANTES DENTRO DEL SUBDOMINIO P2 DE LA PROTEÍNA VP60.

Los resultados obtenidos con las cápsidas quiméricas de RHDV que incorporaban tanto el epítipo B de FCV como el epítipo M2e del virus de la gripe demostraron que dichas construcciones eran capaces de inducir una potente respuesta inmune humoral frente a los epítopos heterólogos insertados en el modelo de ratón. De los tres sitios de inserción en la proteína VP60 evaluados, el correspondiente al bucle L1, en la región apical del subdominio P2 (aa 306-307), resultó ser el más adecuado para tal fin.

Como se indicó en la introducción (apartado 1.4.5), los sitios de inserción evaluados se seleccionaron en base a consideraciones estructurales basadas en el pseudomodelo atómico de la proteína VP60 disponible en su momento. Es decir, se seleccionaron posiciones que, de acuerdo a la información estructural, cabía esperar que toleraran la inserción de secuencias peptídicas sin afectar a la capacidad de la proteína VP60 de adoptar su conformación nativa y autoensamblarse en VLPs. Una vez comprobado que las construcciones quiméricas efectivamente daban lugar a VLPs, se evaluó su capacidad para inducir una respuesta inmune específica frente al epítipo heterólogo incorporado en el modelo de ratón. Siguiendo este enfoque estructural no se disponía de ninguna información previa sobre la inmunogenicidad de los sitios de inserción seleccionados. Únicamente se conocía su localización en las VLPs de RHDV, y por tanto se tenía información sobre su accesibilidad al sistema inmune, un parámetro considerado importante para la inducción de una eficiente respuesta humoral.

Para profundizar en el conocimiento del sistema y en la medida de lo posible mejorar el potencial de las VLPs de RHDV como plataforma para la presentación de epítopos B heterólogos, se decidió llevar a cabo un análisis orientado a la identificación de regiones lineales inmunodominantes presentes la secuencia del subdominio P2 de la proteína VP60, con el fin de localizar posibles nuevos sitios de inserción para epítopos B. La idea era adoptar un enfoque inverso al anterior: identificar potenciales sitios de inserción en base a información sobre su inmunogenicidad y posteriormente analizar sus características estructurales, para tratar de valorar la viabilidad de su empleo para la incorporación de epítopos heterólogos, sin interferir con la capacidad de la proteína VP60 de autoensamblarse en forma de VLPs.

El estudio se abordó mediante ensayos de PEPSCAN (apartado 3.11). Para ello se empleó una colección de 39 péptidos sintéticos que se usaron como antígeno en los ensayos de ELISA frente a los sueros correspondientes. Cada péptido contenía 12 aminoácidos con un solapamiento de 8

aminoácidos con el siguiente, abarcando en conjunto la secuencia completa del subdominio P2 de la proteína VP60 (aminoácidos 286-449, 164 en total). Los péptidos estaban biotinilados en el extremo N-terminal y contenían una secuencia espaciadora (SGSG) entre la biotina y la secuencia derivada de la proteína VP60.

Los ensayos de PEPSCAN se realizaron empleando sueros de animales previamente inmunizados con VLPs de RHDV. Se analizaron sueros procedentes de tres especies diferentes: ratón, cerdo y conejo. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 4.19** que representa la reactividad de los sueros analizados (medias geométricas de cada grupo de animales) frente a cada péptido.

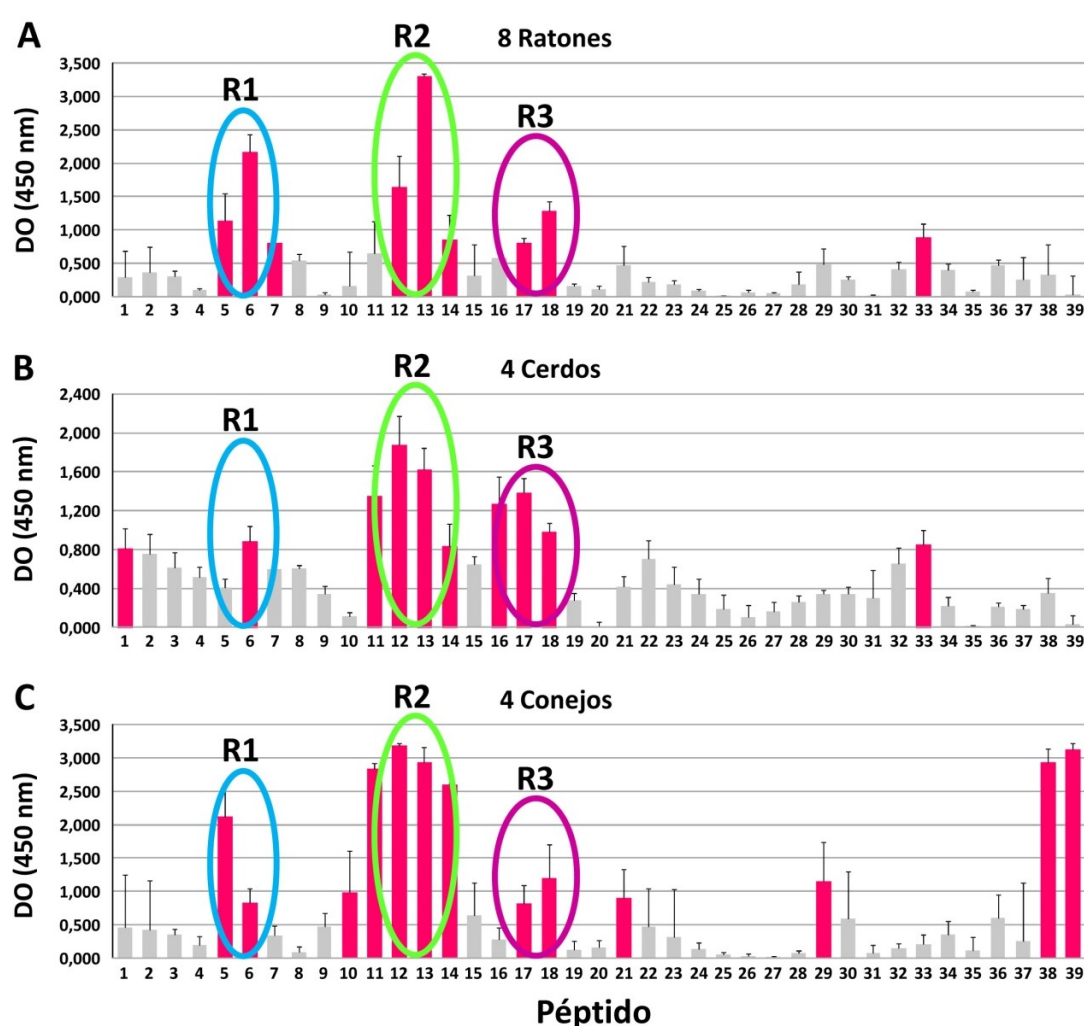
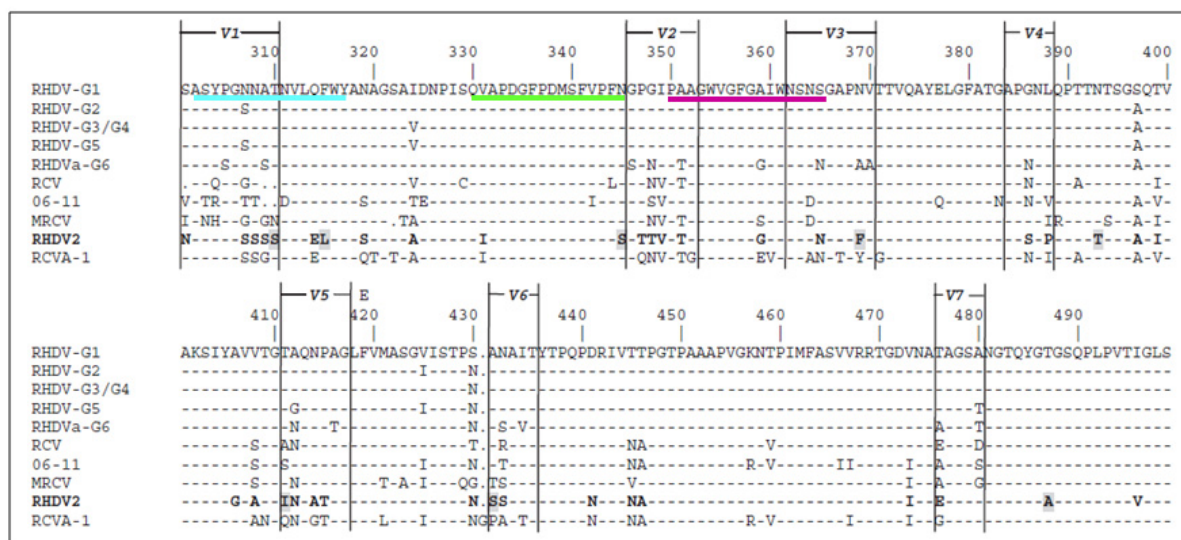


Figura 4.19. Identificación de regiones lineales inmunodominantes en el subdominio P2 de la proteína VP60 (PEPSCAN). Se hicieron ensayos de ELISA empleando como antígenos 39 péptidos sintéticos de 12 aminoácidos, que solapaban 8 aminoácidos con el siguiente, abarcando la secuencia del subdominio P2 de la proteína VP60 (aminoácidos 286-449, 164 en total). Se analizaron sueros de 8 ratones (A), 4 cerdos (B) y 4 conejos (C) previamente inmunizados con VLPs de RHDV. Cada barra representa la media geométrica de la reactividad del número de sueros indicado para cada especie, frente a cada péptido. Las barras con valores de DO (450nm) superiores a 0,800 se señalan en rojo, el resto en gris. Las barras de error indican el error estándar de la media. Se señalan tres regiones inmunodominantes conservadas (R1, R2 y R3).

Como se puede ver, los perfiles de reactividad frente a los péptidos de los sueros de las tres especies fueron similares. El análisis permitió identificar tres regiones inmunodominantes (*hotspots*) conservadas entre las tres especies ensayadas. La máxima reactividad se alcanzó en los tres casos en la región centrada en los péptidos 12 y 13 (región R2), correspondientes a los aa 330-341 y 334-345 de la proteína VP60, respectivamente. Se identificó un segundo pico de reactividad en la región centrada en los péptidos 5 y 6 (región R1), correspondientes a los aa 302-313 y 306-317, respectivamente. Ambos péptidos contenían el sitio de inserción ubicado en el bucle L1 (aa 306-307), empleado para la construcción de las VLPs quiméricas descritas anteriormente (el sitio L mostrado en la [Figura 1.6](#)). Por último, se detectó un tercer pico de reactividad, más reducido que los anteriores en el caso de los sueros de ratones y conejos, y segundo en intensidad en el caso de los sueros de cerdos, centrado en los péptidos 17 y 18 (región R3), correspondiente a los aa 350-361 y 354-365, respectivamente. Por otro lado, el análisis identificó un destacado pico de reactividad reconocido exclusivamente por los sueros de conejos, centrado en los péptidos 38 y 39, correspondientes a los aa 434-445 y 438-449, respectivamente.

Localización de las regiones lineales inmunodominantes



Le Gall-Reculé et al. *Veterinary Research* (2013), 44:81

R1

ASYPGNNATNVL Pept.5 [302-313]
GNNATNVLQFWY Pept.6 [306-317]

R2

QVAPDGFDMSE Pept.12 [330-341]
DGFDMSEFVPFN Pept.13 [334-345]

R3

PAAGWVGFGAIW Pept.17 [350-361]
WVGFGAIWNSNS Pept.18 [354-365]

Figura 4.20. Localización de las regiones lineales inmunodominantes en la secuencia de la proteína VP60. Se muestra la localización de las regiones R1, R2 y R3 sobre un alineamiento de secuencias de aminoácidos consenso de la proteína VP60 de los lagovirus, representativo de 47 secuencias pertenecientes a los distintos genogrupos [publicado en (125)]. Las zonas V1 a V7 indican tramos de secuencia hipervariables entre los lagovirus (240). Abajo se indican las secuencias de los péptidos que componen las tres regiones inmunodominantes consideradas.

La **Figura 4.20** muestra la localización de las tres regiones lineales inmunodominantes conservadas, sobre un alineamiento de secuencias de aminoácidos consenso de la proteína VP60 de los distintos genogrupos de Lagovirus (125). La región R1 (aa 302-317) abarca la práctica totalidad de la zona hipervariable V1, la zona que concentra la mayor variabilidad de secuencia en la proteína VP60 entre los lagovirus (125, 240). Por contraste, la región R2 (aa 330-345) se localiza en la zona más conservada dentro del subdominio P2 de la proteína VP60 entre los lagovirus. La región R3 (aa 350-365) abarca una zona que incluye parte de las regiones hipervariables V2 y V3.

Finalmente, la **Figura 4.21** muestra la localización de las tres regiones lineales inmunodominantes conservadas, en relación a la estructura de la proteína VP60 y de las VLPs de RHDV.

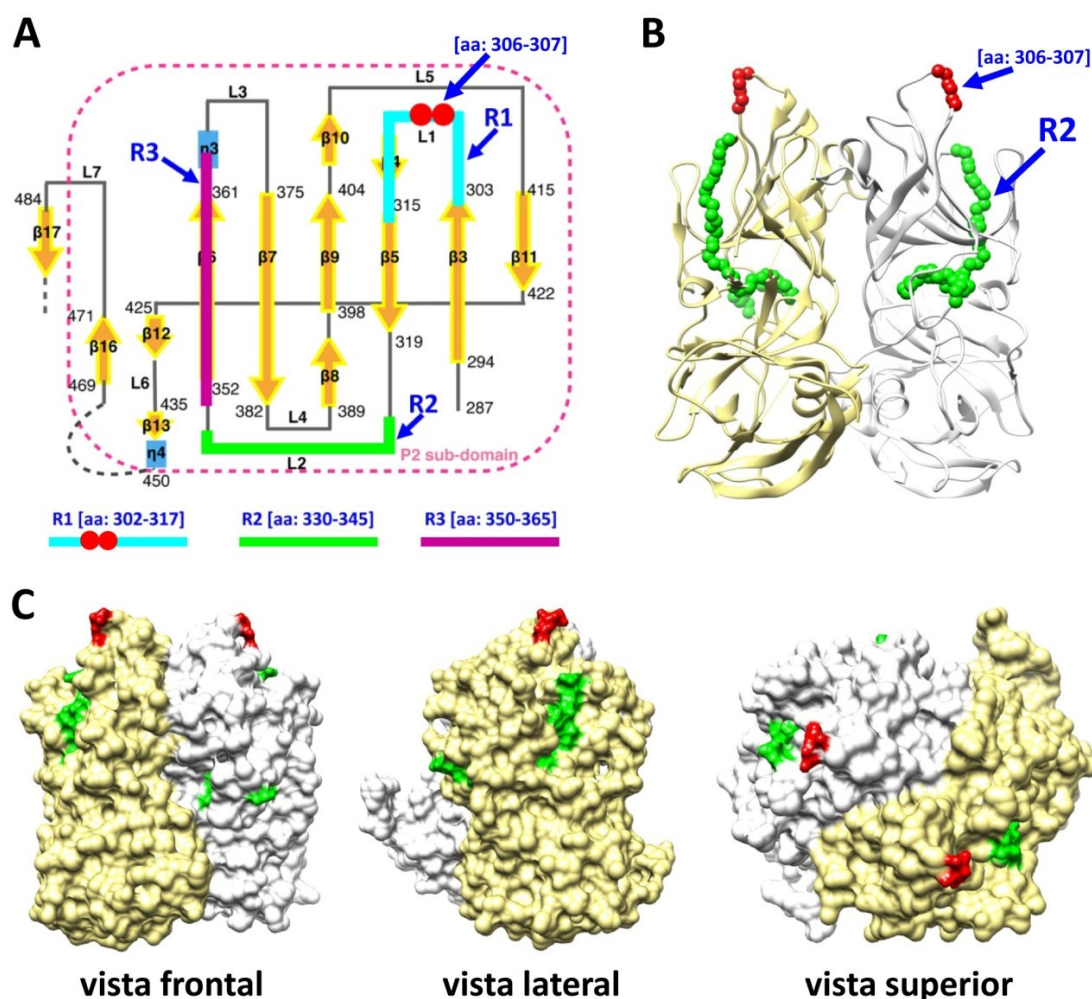


Figura 4.21. Localización de las regiones lineales inmunodominantes en la estructura de la proteína VP60. (A) Diagrama de la topología del subdominio P2 de la proteína VP60 (modificado a partir de (240)). Se indica la localización de las regiones inmunodominantes R1, R2 y R3. Con dos círculos rojos se señala la posición de los residuos 306-307 (sitio de inserción en el bucle L1). (B) Modelo estructural del dímero del dominio P de la proteína VP60 (PDB 4EGT). Se indican las posiciones de los residuos 306-307 y de la región R2. (C) Estructura tridimensional de la superficie externa del dímero del dominio P de la proteína VP60 en vista frontal, lateral y superior. Se indican las posiciones de los residuos 306-307 (rojo) y la región R2 (verde).

Se puede ver que la región R1 coincide básicamente con el bucle L1 del subdominio P2 de la proteína VP60 (Figura 4.21A). Esta zona contiene por tanto el sitio de inserción ubicado entre los residuos 306-307, como se indicó más arriba. La región R2 forma parte del bucle L2 del subdominio P2 mientras que la región R3 abarca completamente un elemento de estructura secundaria: la lámina beta $\beta 6$ (aa: 353-360).

5. DISCUSIÓN

Las partículas virales constituyen nanomateriales de origen natural que van adquiriendo una atención creciente debido a su potencial uso en diversas aplicaciones biomédicas, entre ellas el desarrollo de vacunas (119, 128, 208, 212, 218, 250).

Las VLPs son ensamblados supramoleculares que mimetizan la estructura de las partículas víricas pero carecen de genoma viral (109, 146). Se componen de múltiples copias de una o más proteínas virales, y a menudo son antigénicamente indistinguibles de viriones o partículas subvíricas (188). Las propiedades inmunogénicas inherentes a las VLPs, derivadas de su estructura altamente organizada, repetitiva y similar en tamaño y morfología a los virus, hacen de ellas una de las estrategias más prometedoras para el desarrollo de nuevas estrategias vacunales (9, 216, 235). En la actualidad existen vacunas basadas en VLPs autorizadas y disponibles comercialmente, tanto para enfermedades animales como humanas, además de otras muchas en fases avanzadas de ensayos clínicos (36, 51, 197, 256).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que las VLPs de RHDV se producen fácilmente y con elevado rendimiento, son altamente inmunogénicas y pueden ser empleadas como reactivos de diagnóstico o vacunas para el control del virus RHDV en poblaciones de conejo (19, 22, 136, 176). Por otro lado, hemos demostrado también que las VLPs de RHDV constituyen una buena plataforma para la inducción de respuesta inmune celular frente a epítomos heterólogos T-cooperadores (CD4+) y citotóxicos (CD8+), tanto en modelo de ratón como en cerdo (50, 53). Otros grupos han abordado el potencial de las VLPs de RHDV como plataformas para la presentación de antígenos tumorales reconocidos por células T, demostrando su capacidad para inducir una inmunidad protectora frente a tumores (129, 174). Las VLPs de RHDV son eficientemente capturadas por las células dendríticas (50, 54, 244), que a su vez presentan los epítomos T heterólogos (por la vía MHC de clase I) iniciando así la respuesta T-citotóxica (53, 129, 244).

En este trabajo nos propusimos ampliar el potencial de las VLPs de RHDV como plataforma para el desarrollo de nuevas vacunas, evaluando su capacidad para inducir una respuesta humoral específica frente a epítomos B heterólogos presentados por VLPs quiméricas. Empleando como modelo un epítomo B neutralizante derivado del calicivirus felino (FCV22), previamente identificado y caracterizado en nuestro laboratorio, estudiamos la influencia del sitio de inserción en la proteína VP60 y del número de copias del epítomo incorporadas por monómero en la respuesta humoral inducida por las VLPs quiméricas. Además, con objeto de determinar la capacidad de las VLPs quiméricas de RHDV para inducir una respuesta inmune protectora, se

diseñaron nuevas construcciones que incorporaban la secuencia correspondiente al dominio extracelular de la proteína M2 del virus de la gripe, M2e. En un modelo de ratón, se evaluó la inmunogenicidad de dichas construcciones, así como su capacidad para proteger frente a un desafío letal con el virus de la gripe. Los resultados obtenidos en esta tesis complementan los estudios anteriores, confirmando el potencial de las VLPs de RHDV como una excelente plataforma vacunal, al demostrar su capacidad para inducir una potente respuesta humoral neutralizante y con capacidad protectora frente a epítomos B heterólogos. Además, se aportan datos prácticos de interés para el diseño de futuras vacunas, determinando sitios óptimos de inserción, así como la longitud de las secuencias peptídicas que pueden ser presentadas.

5.1. INFLUENCIA DEL SITIO DE INSERCIÓN Y EL NÚMERO DE COPIAS DEL EPÍTOPO B HETERÓLOGO EN LA RESPUESTA HUMORAL INDUCIDA POR LAS VLPs QUIMÉRICAS.

El primer objetivo de esta tesis fue diseñar y obtener VLPs quiméricas de RHDV capaces de inducir anticuerpos específicos frente a un epítomo B heterólogo y neutralizante (FCV22), inserto en las mismas. Un problema potencial que cabía esperar era la conocida elevada inmunogenicidad intrínseca de las VLPs de RHDV (124, 160, 178, 252), que podía suponer un obstáculo para la consecución del objetivo, puesto que la elevada respuesta inmune inducida por las regiones inmunodominantes de la cápsida de RHDV podría enmascarar cualquier respuesta inmune específica dirigida frente al epítomo incorporado. Por otro lado, la generación de VLPs quiméricas es un proceso en buena medida empírico, de manera que no se puede anticipar con certeza si una secuencia peptídica concreta podrá ser incorporada en las VLPs, sin interferir con el correcto autoensamblaje de las mismas (84). Por ello, con el fin de incrementar las posibilidades de éxito, decidimos evaluar la incorporación del epítomo heterólogo en tres sitios de inserción distintos, así como incorporar diferente número de copias del epítomo por monómero.

El epítomo FCV22, derivado de la proteína de la cápsida del virus FCV, se localiza en el bucle B'C' dentro del subdominio P2 de la proteína VP62 [aa 440-459] (170) (Figura 1.7). El epítomo fue identificado en el proceso de mapeo epitópico de anticuerpos monoclonales neutralizantes obtenidos en nuestro laboratorio. Por ello, cabía esperar que VLPs quiméricas que incorporaran dicho epítomo fueran capaces de inducir respuesta inmune neutralizante frente a FCV. Los resultados obtenidos demostraron que efectivamente así fue, ilustrando la aplicabilidad de las VLPs de RHDV como plataforma para la producción de anticuerpos con especificidad dirigida frente a secuencias peptídicas de interés.

En relación con la influencia del sitio de inserción sobre la respuesta de anticuerpos específica inducida por las VLPs quiméricas, la posición localizada en el bucle L1, dentro del subdominio P2 de la proteína VP60, resultó ser la más eficiente. Así, la construcción L1FCV indujo la respuesta inmune más sólida, caracterizada por títulos de anticuerpos específicos más altos y más consistentes (menor dispersión en los títulos de anticuerpos inducidos por los ratones del grupo). Además, los títulos de anticuerpos inducidos frente al epítipo FCV22 por la construcción quimérica L1FCV resultaron más elevados que aquellos inducidos por las VLPs nativas de FCV, que presentan el epítipo en su contexto natural (Figura 4.5B), un resultado que realza aún más la idoneidad de la región situada en el bucle L1 de la proteína VP60 como sitio de inserción para la óptima presentación de epítopos B foráneos.

Varios factores podrían contribuir a explicar las diferencias observadas en relación con el sitio de inserción. En primer lugar, la incorporación del epítipo B heterólogo en el bucle L1 de los monómeros de VP60 que componen las VLPs de RHDV claramente confiere una mayor accesibilidad de la secuencia insertada al sistema inmune, en comparación con la inserción en los extremos N-terminal (orientados hacia el interior de la cápsida de RHDV) o en los extremos C-terminal (localizados en las depresiones en forma de copa pentaméricas y hexaméricas). Otro factor relevante podría ser el estatus de inmunodominancia de la región escogida para la incorporación del epítipo B heterólogo. Cabe destacar que el sitio de inserción localizado en el bucle L1 (entre las posiciones 306 y 307) se encuentra dentro de la región variable V1 (aminoácidos 301-310), una de las siete regiones de elevada variabilidad definidas en la proteína VP60 (240) (Figura 4.20). De hecho, la región V1 constituye la zona de mayor variabilidad de secuencia de aminoácidos en la proteína VP60, entre aislados de RHDV y entre los distintos lagovirus (125). Asimismo, se han descrito anticuerpos monoclonales dirigidos frente a esta región que son capaces de discriminar entre cepas del virus RHDV y cepas del virus RHDV2 (19, 117). Además, experimentos realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, empleando péptidos sintéticos que abarcaban el bucle L1 completo (aa:300-318), mostraron que esta región está implicada en las interacciones virus-huésped y que estimula la producción de anticuerpos neutralizantes protectores (240). En conjunto, los datos previos indicaban que la región del bucle L1 de la proteína VP60 juega un papel relevante en la definición de la antigenicidad e inmunogenicidad de la cápsida de RHDV. Los resultados aportados por este trabajo refuerzan las evidencias del estatus inmunodominante del bucle L1. Así, la incorporación de epítopos B heterólogos en esta localización no sólo dio como resultado la inducción de títulos altos de anticuerpos frente al epítipo B insertado (Figuras 4.5B, 4.11B y 4.14B), sino que además provocó una reducción

significativa de los títulos de anticuerpos frente a la proteína VP60 inducidos por las VLPs quiméricas, en comparación con aquellos inducidos por las VLPs de RHDV nativas (Figuras 4.5A, 4.11A y 4.14A). Por otro lado, los resultados de los ensayos de PEPSCAN confirmaron que la región R1 (aa 302-317) es una de las zonas lineales inmunodominantes de la proteína VP60 (Figuras 4.19). Finalmente, otro factor a tener en cuenta es el hecho de que la incorporación de epítomos heterólogos en el bucle L1 debería dar como resultado la presentación de dichos epítomos en forma de bucles cerrados, es decir, con una configuración restringida, al estar ambos extremos conectados con la secuencia de la proteína VP60. Por el contrario, la incorporación de epítomos heterólogos en los extremos terminales de la proteína de la cápsida, da como resultado que la secuencia insertada quede con un extremo libre (bien el N o el C-terminal), permitiendo por tanto que las secuencias insertadas adopten configuraciones más laxas y puedan presentar una mayor movilidad. A este respecto, estudios previos sobre la relación entre la estructura tridimensional de un epítopo heterólogo insertado en la cápsida del virus del mosaico del caupí (CPMV) y la inmunogenicidad específica inducida (226), revelaron que la presentación en forma de bucle cerrado puede resultar determinante para mimetizar de forma precisa la estructura de ciertos epítomos que adoptan configuraciones tridimensionales precisas en su contexto nativo, y sólo de esta manera inducen una adecuada respuesta inmune, mientras que en el caso de antígenos que pueden actuar como epítomos lineales o que son funcionales incluso en forma desnaturalizada, no es un requerimiento esencial lograr mimetizar su estructura de una manera precisa, para conseguir inducir niveles adecuados de respuesta inmune específica (64, 217).

El número de copias del epítopo B heterólogo incorporadas por monómero de la cápsida de RHDV también se demostró determinante en la magnitud de la respuesta inmune específica inducida por las VLPs quiméricas. El incremento del número de copias del epítopo incorporadas por monómero resultó en un incremento significativo del título de anticuerpos específicos dirigidos frente a él (Figura 4.5B), así como en un aumento concomitante de la actividad neutralizante inducida por las VLPs quiméricas (Figura 4.6). Los mejores resultados se obtuvieron con las construcciones L3FCV y NLCFCV, ambas portadoras de tres copias del epítopo FCV22 por monómero de VP60 (540 copias por VLP). Estos resultados fueron concordantes con los de trabajos previos, centrados en analizar el papel de la repetitividad y la organización espacial de los epítomos presentados en la inducción de la respuesta inmune humoral, empleando diferentes abordajes: haptenos incorporados a moléculas poliméricas (70), proteínas portadoras solubles (134) o VLPs conjugadas (102). Dichos trabajos coincidían en señalar la importancia de alcanzar

elevadas densidades locales del epítipo B de interés, con el fin de lograr la inducción de una óptima respuesta inmune humoral.

5.2. RESPUESTA INMUNE PROTECTIVA INDUCIDA POR LAS VLPs QUIMÉRICAS QUE INCORPORAN EL EPÍTOPO M2e.

Los resultados obtenidos con las VLPs RHDV-FCV22 permitieron demostrar el potencial de la plataforma basada en las VLPs de RHDV, para inducir una potente respuesta neutralizante frente a un epítipo B heterólogo, en ensayos *in vitro* (ensayos de reducción del número de placas de lisis). Sin embargo, este modelo basado en un epítipo del virus FCV no resultaba adecuado para evaluar la capacidad de las VLPs quiméricas de RHDV para inducir una respuesta inmune protectora *in vivo*, que habría tenido que ser analizada en gatos, algo que no estaba al alcance de nuestro laboratorio.

Con objeto de poder valorar la eficacia protectora de la respuesta inmune inducida por las VLPs quiméricas de RHDV, se optó por seleccionar un modelo de patógeno conveniente. Se escogió el virus de la gripe, un patógeno relevante tanto en sanidad veterinaria como humana y uno de los mayores retos actuales en el campo del desarrollo de vacunas (181, 253). Además, la elección del virus de la gripe se vio favorecida por la existencia de cepas virales adaptadas a ratón (35) y de herramientas de investigación que permiten realizar estudios de infección y protección *in vivo* utilizando este modelo animal de manejo sencillo y económico.

La proteína M2 es una proteína transmembrana del virus de la gripe, que se expresa en altos niveles en la superficie de las células infectadas por este virus (123), pero de forma escasa en la membrana de la partícula viral (254). En su forma fisiológica, M2 es un tetrámero (Figura 1.8), cuyo segmento extracelular N-terminal (M2e) se corresponde con un epítipo de secuencia muy conservada entre cepas virales distantes genéticamente, tanto de origen humano como aviar (82). Se ha demostrado que diversas estrategias vacunales basadas en el inmunógeno M2e son capaces de inducir protección frente a la infección por el virus de la gripe (82, 103, 163), por lo que este inmunógeno constituye en la actualidad un candidato prometedor para el desarrollo de vacunas con capacidad de inducir protección cruzada o "universales" frente al virus de la gripe. Sin embargo, el péptido M2e es muy poco inmunogénico *per se* (5) o en su contexto natural, tanto en el curso de infecciones con el virus de la gripe como tras la vacunación con virus inactivado (80, 101). Por lo tanto, la efectividad de las vacunas basadas en M2e requiere del empleo de abordajes que sean capaces de potenciar significativamente su inmunogenicidad. Por esta razón, el epítipo

M2e resulta atractivo para evaluar plataformas vacunales basadas en VLPs y ha sido empleado previamente con VLPs derivadas de hepatitis B (163), del papiloma humano (98), del bacteriófago QB (29) o del virus de la bursitis infecciosa aviar (172).

Los mecanismos inmunológicos que median la protección frente al virus de la gripe conferida por el inmunógeno M2e han sido analizados en detalle (67, 74, 101). Se sabe que M2e induce una respuesta humoral protectora sin inducir neutralización de la entrada del virus en las células. Los anticuerpos anti-M2 inducidos se unen a la proteína M2 presente en la membrana de las células infectadas mediando su eliminación por parte de células NK (citotoxicidad mediada por anticuerpos, ADCC), limitando así la propagación del virus en el organismo infectado. Por lo tanto, el epítipo M2e presentaba características inmunogénicas diferentes a las del epítipo neutralizante FCV22, y también desde este punto de vista resultaba de interés su evaluación en la plataforma basada en las VLPs de RHDV.

Para valorar la capacidad de inducir respuesta inmune protectora de las VLPs de RHDV, se generaron tres construcciones quiméricas que incorporaban una copia del péptido M2e en cada uno de los sitios de inserción en la proteína VP60 empleados en este trabajo: el bucle L1, extremo N-terminal y extremo C-terminal. Los resultados obtenidos demostraron que las VLPs quiméricas de RHDV son capaces de inducir una respuesta potente de anticuerpos específicos frente a M2e, tras la administración de dos dosis vacunales, mientras que la mayoría de los estudios publicados con otras plataformas de VLPs basadas en M2e, siguieron una pauta de vacunación con tres dosis vacunales (29, 98, 163).

En relación con la influencia del sitio de inserción empleado para la incorporación del epítipo B sobre la respuesta humoral específica inducida, en concordancia con los resultados obtenidos con las VLPs quiméricas portadoras del epítipo FCV22, la construcción que incorporaba el epítipo M2e en el bucle L1 (LM2e) fue la que indujo los títulos de anticuerpos específicos más elevados (Figuras 4.11B y 4.14B). Dicha construcción fue además la que indujo mayores niveles protección frente al desafío letal con el virus de la gripe, tanto en términos de tasa de supervivencia (87.5%) como de morbilidad (pérdida de peso medio del grupo del 17.84%) (Figura 4.17). En consonancia con trabajos previos reportados por otros autores (101, 163, 230), nuestros resultados sugieren que la protección inducida por M2e frente al virus de la gripe está mediada fundamentalmente por la respuesta de anticuerpos específicos frente a dicho epítipo. De hecho, los resultados obtenidos en esta tesis muestran una clara correlación entre el título de IgGs anti-M2e inducido por las VLPs quiméricas y el nivel de protección alcanzado (Figura 4.18), de manera que un título

de IgG específicas frente a M2e ≥ 39.985 , puede considerarse como correlato de protección frente al desafío letal con el virus de la gripe en ratones en las condiciones experimentales empleadas .

La inducción de una adecuada inmunidad en mucosas resulta especialmente relevante para el control de patógenos respiratorios, como el virus de la gripe. Así, se ha demostrado que la inducción de una buena respuesta inmune no sólo sistémica sino también en pulmón, puede ser fundamental en la protección frente al virus de la gripe (29, 157, 210). Por esta razón, se evaluó la capacidad de las VLPs quiméricas para activar la inmunidad local, analizando la frecuencia de CSA específicas frente a M2e en los pulmones de los ratones inmunizados con dichas construcciones. Los resultados obtenidos evidenciaron que las VLPs quiméricas, administradas por vía subcutánea, son muy eficientes induciendo CSA anti-M2e en pulmón (Figura 4.15). La respuesta inmune local detectada presentó características similares a la respuesta humoral sistémica, siendo la construcción quimérica LM2e la que indujo las mayores frecuencias de CSA anti-M2e, tanto en pulmón como en bazo.

Aunque la inducción de respuesta inmune en mucosas suele requerir de la administración del inmunógeno por esa vía (85, 223), existen numerosas evidencias que demuestran que también puede inducirse tras la administración sistémica del inmunógeno (25), como parece suceder con las VLPs quiméricas generadas en este trabajo. Uno de los mecanismos que se ha señalado como posible responsable de esta activación de la respuesta inmune local tras la administración parenteral de la vacuna está relacionado con la capacidad del adyuvante y/o antígeno para activar una migración eficiente de las células dendríticas hacia tejidos asociados a mucosas, lo que de este modo promocionaría la inmunidad local (77). Dadas las propiedades inmunogénicas intrínsecas de las VLPs de RHDV, y en particular su capacidad para ser capturadas eficientemente por las células dendríticas y activarlas (53, 54, 129, 244), no se puede descartar que estas VLPs además sean capaces de favorecer su migración y por tanto la respuesta inmune en el pulmón.

Como ya se ha mencionado en este apartado, la protección frente al virus de la gripe inducida por M2 está mediada fundamentalmente por anticuerpos, pero algunos autores han descrito también la posible contribución de las células T a dicha protección (186, 230). De hecho, en el dominio de M2e se ha identificado un epítipo T restringido por el MHC de clase II en ratones BALB/c (76). Por ello, decidimos evaluar la respuesta celular específica frente a M2e inducida por las VLPs quiméricas, realizando ensayos de ELISPOT que nos permitieran determinar la frecuencia de células productoras de IFN γ . Los resultados obtenidos demuestran que las VLPs quiméricas de RHDV son capaces de inducir además de respuesta humoral una respuesta celular específica

potente frente a M2e. Los análisis realizados no incluyeron el fenotipado de las células respondedoras, pero en base a trabajos publicados previamente, el fenotipo de las células productoras de IFN γ podría ser tanto CD4 $^{+}$ como CD8 $^{+}$ (76). La capacidad de las VLPs de RHDV de inducir respuesta celular específica frente a M2e es consistente con los resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, analizando la respuesta inducida por VLPs quiméricas de RHDV presentadoras de epítomos T cooperadores o citotóxicos de otros patógenos (50, 53), .

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que las VLPs quiméricas de RHDV presentadoras del epítomo M2e son capaces de inducir una respuesta inmune tanto humoral como celular efectiva, capaz de proteger frente al desafío letal con el virus de la gripe. La protección inducida por estas VLPs correlaciona con la respuesta sistémica de anticuerpos específicos frente a M2e, sin que se pueda descartar la contribución adicional de otros mecanismos como la inducción de respuesta humoral local en pulmón y/o la activación de una respuesta celular T específica frente a M2e.

5.3. IDENTIFICACIÓN DE REGIONES LINEALES INMUNODOMINANTES.

Finalmente, se desarrolló un análisis orientado a la identificación de regiones lineales inmunodominantes presentes la secuencia del subdominio P2 de la proteína VP60. Este trabajo tenía como objetivo profundizar en la caracterización de la plataforma basada en las VLPs de RHDV, y además el fin práctico de tratar de identificar posibles nuevos sitios de inserción para epítomos B heterólogos, que complementaran o incluso mejoraran los sitios de inserción ya disponibles. Con esta idea se diseñaron los ensayos de PEPSCAN.

Se decidió llevar a cabo los ensayos empleando sueros de animales previamente inmunizados con VLPs de RHDV de tres especies diferentes: ratón, conejo y cerdo. Se emplearon diversos modelos animales porque nuestro interés se orientaba a tratar de identificar regiones lineales inmunodominantes en la proteína VP60 que estuvieran conservadas entre especies. De esta manera, la información obtenida sería potencialmente útil para el diseño posterior de VLPs quiméricas versátiles, adecuadas para diferentes aplicaciones. Las tres especies se seleccionaron en base a las siguientes consideraciones: el ratón es un modelo animal ampliamente utilizado en los estudios iniciales de nuevos desarrollos vacunales, tanto en el campo de la salud humana como en el de la sanidad animal, por las facilidades que ofrece y la disponibilidad de técnicas y reactivos para la realización de ensayos *in vivo*. Por su parte el conejo, además de ser un modelo animal de laboratorio clásico, es el hospedador natural del virus RHDV, lo que añadía un interés

adicional para su inclusión en este estudio. En cuanto al cerdo, es una de las principales especies ganaderas y modelo relevante en el ámbito de la sanidad animal, en el que se desenvuelve la línea de trabajo de nuestro laboratorio.

En conjunto, los datos obtenidos a partir de los ensayos de PEPSCAN permitieron extraer algunas conclusiones. El subdominio P2 de la proteína VP60 contiene tres regiones lineales inmunodominantes conservadas (Figura 4.19), reconocidas mayoritariamente por sueros de animales de diferentes especies (ratón, cerdo, conejo) que previamente habían sido inmunizados con VLPs de RHDV. La región R1 coincide con el bucle L1. Esto confirma que el sitio de inserción ubicado entre los residuos 306-307, empleado para generar las VLPs quiméricas que ofrecieron los mejores resultados de respuesta humoral específica frente a epítomos B heterólogos, descritas en esta tesis, es una de las regiones lineales inmunodominantes de la proteína VP60, lo que refuerza la idoneidad de este sitio de inserción para la generación de VLPs de RHDV quiméricas. La región R3 abarca un elemento importante de estructura secundaria (lámina beta $\beta 6$). Esto sugiere que no sería una buena opción para emplear dicha zona como sitio de inserción, ya que sería muy probable que la introducción de secuencias heterólogas en dicha localización conllevara abrogar dicha estructura secundaria, alterando así la capacidad de la proteína VP60 para adquirir su conformación nativa y autoensamblarse en forma de VLPs. Además, de las tres regiones identificadas, la región R3 fue la que en conjunto ofreció valores de reactividad con los sueros más modestos (Figura 4.19). Por último, la región R2 (aa: 330-345) resultó ser el hallazgo más prometedor del estudio de PEPSCAN, de cara a nuevos desarrollos de las VLPs de RHDV como plataforma vacunal. Dicha región fue la que exhibió valores de reactividad más altos con los sueros de animales inmunizados de las tres especies empleadas (Figura 4.19). Se ubica en el bucle L2 del subdominio P2, abarcando una secuencia que no contiene elementos de estructura secundaria definidos (Figura 4.21A y B), y ambos extremos de dicha región (aa: 330-334 y 340-345) se localizan en zonas accesibles en la superficie de las VLPs (Figura 4.21C). Por lo tanto, la región R2 constituye una zona potencialmente propicia para identificar nuevos sitios de inserción de cara a la generación de VLPs de RHDV quiméricas para uso vacunal.

5.4. CONSIDERACIONES FINALES SOBRE LAS VLPs QUIMÉRICAS DE RHDV QUE INCORPORAN EPÍTOPOS B HETERÓLOGOS.

En resumen, empleando dos epítomos B heterólogos de características diferentes, hemos demostrado que la plataforma vacunal basada en las VLPs de RHDV es capaz de inducir una potente respuesta de anticuerpos neutralizantes específicos, así como una eficiente respuesta

inmune protectora frente a un desafío viral letal. Cabe destacar que las VLPs de RHDV han demostrado ser muy tolerantes a la inserción de secuencias peptídicas heterólogas, admitiendo no sólo la inserción de epítomos en diferentes localizaciones, sino también permitiendo la incorporación de varias copias en tándem de un mismo epítomo en un sitio de inserción, o la inserción simultánea de epítomos en las tres posiciones evaluadas. La disponibilidad de al menos tres sitios de inserción por monómero de la cápsida, así como la tolerancia para incorporar secuencias heterólogas relativamente largas en cada posición, ofrecen la oportunidad para el diseño de estrategias vacunales versátiles. Así, puede incorporarse un mismo epítomo en diferentes posiciones y/o en diferentes copias en tándem, como se hizo en este trabajo, para incrementar la respuesta inmune específica frente al epítomo de interés. Alternativamente, podrían incorporarse a las VLPs epítomos distintos simultáneamente, abriendo la posibilidad de generar vacunas multivalentes. Es interesante destacar que nuestros trabajos anteriores demostraron que para inducir respuesta inmune celular frente a epítomos T heterólogos, incorporados a VLPs quiméricas de RHDV, la mejor opción era la inserción de dichos epítomos en el extremo N-terminal de la proteína VP60 (50). Por tanto, tras los resultados obtenidos en esta tesis, se plantea la posibilidad de generar VLPs quiméricas de RHDV que incorporen simultáneamente epítomos B y T heterólogos, en el bucle L1 y en el extremo N-terminal, respectivamente. El empleo combinado de diferentes tipos de epítomos inmunogénicos (B, CD4+, and CD8+) incorporados en distintas localizaciones de las VLPs de RHDV, allana el camino para el desarrollo de vacunas multiméricas altamente eficaces, capaces de estimular las diferentes ramas del sistema inmune.

Se ha descrito que la presencia de anticuerpos preexistentes frente a cápsidas virales puede producir un efecto adverso sobre la eficacia de las vacunas basadas en VLPs derivadas de dichas cápsidas (63). Este es un problema potencial que afrontan las plataformas vacunales basadas en VLPs que derivan de virus con alta prevalencia en humanos o especies ganaderas relevantes (63, 224). Puesto que el virus RHDV tiene un tropismo estrictamente restringido a conejos (2), no es esperable encontrar inmunidad preexistente frente a las VLPs de RHDV en otras especies.

En conclusión, los resultados de esta tesis demuestran que las VLPs de RHDV constituyen una plataforma atractiva para el desarrollo de nuevas vacunas, tanto en el área de salud humana como en medicina veterinaria.

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones y aportaciones de este trabajo son las siguientes:

1. Las VLPs de RHDV constituyen excelentes plataformas para la presentación multimérica de epítomos B foráneos, incluidos los neutralizantes, ya que son capaces de inducir una potente respuesta inmune humoral específica frente a dichos epítomos.

2. Las VLPs de RHDV son plataformas de presentación de epítomos versátiles. Admiten la inserción de secuencias heterólogas en al menos tres sitios diferentes de la proteína de la cápsida, permitiendo la incorporación de varias copias en tándem de un mismo epítomo en un mismo sitio de inserción, o bien la inserción simultánea de epítomos en las tres posiciones evaluadas, sin que esto afecte al correcto autoensamblaje de las VLPs. Además, admiten la inserción de secuencias relativamente largas: al menos 62 aa en el bucle L1, 42 aa en el extremo N-terminal y 22 aa en el extremo C-terminal.

3. De las tres posiciones de inserción en la proteína VP60 evaluadas, la correspondiente al bucle L1, situado en la región apical del subdominio P2 [aa 306-307], resultó la más adecuada para la inducción de respuesta inmune humoral frente a epítomos B foráneos.

4. El número de copias del epítomo B insertadas por monómero de VP60 es un factor relevante en la magnitud de la respuesta humoral inducida por las VLPs quiméricas frente dicho epítomo. Así, las VLPs quiméricas que incorporaban un mayor número de copias del epítomo por monómero indujeron títulos de anticuerpos específicos más elevados, así como un aumento concomitante de la actividad neutralizante inducida.

5. Las VLPs RHDV-M2e son capaces de inducir una respuesta inmune potente y eficaz de anticuerpos específicos, y una activación de la respuesta celular frente a M2e, capaz de conferir protección frente al desafío con el virus de la gripe. La protección proporcionada por las VLPs quiméricas correlaciona con el título de anticuerpos anti-M2e séricos inducido, quedando protegidos todos los animales con títulos ≥ 39.985 , en las condiciones experimentales empleadas.

6. Se han identificado tres regiones lineales inmunodominantes (*hotspots*) dentro del subdominio P2 de la proteína VP60, conservadas entre las tres especies estudiadas (ratón, conejo y cerdo). De ellas, la región R2, que abarca los aa 330-345 y forma parte del bucle L2, resultó tener la máxima reactividad frente a los sueros de animales de las tres especies, previamente inmunizados con VLPs de RHDV. Esta región R2 constituye por lo tanto una zona potencialmente adecuada como nuevo sitio de inserción de epítomos B heterólogos.

7. Se confirma que el sitio de inserción ubicado entre los residuos 306-307 (bucle L1), empleado para generar las VLPs quiméricas que ofrecieron los mejores resultados de respuesta humoral específica frente a epítomos B heterólogos, es una de las zonas inmunodominantes de la proteína VP60, lo que concuerda con los resultados de inmunogenicidad obtenidos y refuerza la idoneidad de este sitio de inserción.

7. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. **Abrantes, J., A. M. Lopes, K. P. Dalton, P. Melo, J. J. Correia, M. Ramada, P. C. Alves, F. Parra, and P. J. Esteves.** 2013. New variant of rabbit hemorrhagic disease virus, Portugal, 2012-2013. *Emerg Infect Dis* **19**:1900-2.
2. **Abrantes, J., W. van der Loo, J. Le Pendu, and P. J. Esteves.** 2012. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Vet Res* **43**:12.
3. **Almanza, H., C. Cubillos, I. Angulo, F. Mateos, J. R. Caston, W. H. van der Poel, J. Vinje, J. Barcena, and I. Mena.** 2008. Self-assembly of the recombinant capsid protein of a swine norovirus into virus-like particles and evaluation of monoclonal antibodies cross-reactive with a human strain from genogroup II. *J Clin Microbiol* **46**:3971-9.
4. **Anderson, E. J.** 2010. Prevention and treatment of viral diarrhea in pediatrics. *Expert Rev Anti Infect Ther* **8**:205-17.
5. **Andersson, A. M., K. O. Hakansson, B. A. Jensen, D. Christensen, P. Andersen, A. R. Thomsen, and J. P. Christensen.** 2012. Increased immunogenicity and protective efficacy of influenza M2e fused to a tetramerizing protein. *PLoS One* **7**:e46395.
6. **Angulo, E., and J. Barcena.** 2007. Towards a unique and transmissible vaccine against myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease for rabbit populations. *Wildlife Research* **34**:567-577.
7. **Atmar, R. L.** 2010. Noroviruses - State of the Art. *Food Environ Virol* **2**:117-126.
8. **Bachmann, M. F., and G. T. Jennings.** 2011. Therapeutic vaccines for chronic diseases: successes and technical challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**:2815-22.
9. **Bachmann, M. F., and G. T. Jennings.** 2010. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat Rev Immunol* **10**:787-96.
10. **Bachmann, M. F., and G. T. Jennings.** 2004. Virus-Like Particles: Combining Innate and Adaptive Immunity for Effective Vaccination, p. 415-432. *In* S. H. E. Kaufmann (ed.), *Novel vaccination strategies*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG.
11. **Bachrach, H. L., and W. R. Hess.** 1973. Animal picornaviruses with a single major species of capsid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **55**:141-9.
12. **Baily, J. L., M. P. Dagleish, M. Graham, M. Maley, and M. S. Rocchi.** 2014. RHDV variant 2 presence detected in Scotland. *Vet Rec* **174**:411.
13. **Baker, T. S., N. H. Olson, and S. D. Fuller.** 1999. Adding the third dimension to virus life cycles: three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:862-922, table of contents.
14. **Ball, J. M., M. E. Hardy, R. L. Atmar, M. E. Conner, and M. K. Estes.** 1998. Oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *J Virol* **72**:1345-53.
15. **Bamford, D. H., J. M. Grimes, and D. I. Stuart.** 2005. What does structure tell us about virus evolution? *Curr Opin Struct Biol* **15**:655-63.
16. **Bank-Wolf, B. R., M. Konig, and H. J. Thiel.** 2010. Zoonotic aspects of infections with noroviruses and sapoviruses. *Vet Microbiol* **140**:204-12.
17. **Barcena, J., and E. Blanco.** 2013. Design of novel vaccines based on virus-like particles or chimeric virions. *Subcell Biochem* **68**:631-65.
18. **Barcena, J., and R. Blasco.** 1998. Recombinant swinepox virus expressing beta-galactosidase: Investigation of viral host range and gene expression levels in cell culture. *Virology* **243**:396-405.
19. **Barcena, J., B. Guerra, I. Angulo, J. Gonzalez, F. Valcarcel, C. P. Mata, J. R. Caston, E. Blanco, and A. Alejo.** 2015. Comparative analysis of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and new RHDV2 virus antigenicity, using specific virus-like particles. *Vet Res* **46**:106.
20. **Barcena, J., M. Morales, B. Vazquez, J. A. Boga, F. Parra, J. Lucientes, A. Pages-Mante, J. M. Sanchez-Vizcaino, R. Blasco, and J. M. Torres.** 2000. Horizontal transmissible protection

- against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus. *J Virol* **74**:1114-23.
21. **Barcena, J., M. Ochoa, S. de la Luna, J. A. Melero, A. Nieto, J. Ortin, and A. Portela.** 1994. Monoclonal antibodies against influenza virus PB2 and NP polypeptides interfere with the initiation step of viral mRNA synthesis in vitro. *J Virol* **68**:6900-9.
 22. **Barcena, J., N. Verdaguer, R. Roca, M. Morales, I. Angulo, C. Risco, J. L. Carrascosa, J. M. Torres, and J. R. Caston.** 2004. The coat protein of Rabbit hemorrhagic disease virus contains a molecular switch at the N-terminal region facing the inner surface of the capsid. *Virology* **322**:118-34.
 23. **Barteling, S. J., and J. Vreeswijk.** 1991. Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* **9**:75-88.
 24. **Beck, E., and K. Strohmaier.** 1987. Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J Virol* **61**:1621-9.
 25. **Belyakov, I. M., and J. D. Ahlers.** 2009. What role does the route of immunization play in the generation of protective immunity against mucosal pathogens? *J Immunol* **183**:6883-92.
 26. **Bergin, I. L., A. G. Wise, S. R. Bolin, T. P. Mullaney, M. Kiupel, and R. K. Maes.** 2009. Novel calicivirus identified in rabbits, Michigan, USA. *Emerg Infect Dis* **15**:1955-62.
 27. **Bertagnoli, S., J. Gelfi, F. Petit, J. F. Vautherot, D. Rasschaert, S. Laurent, G. Le Gall, E. Boilletot, J. Chantal, and C. Boucraut-Baralon.** 1996. Protection of rabbits against rabbit viral haemorrhagic disease with a vaccinia-RHDV recombinant virus. *Vaccine* **14**:506-10.
 28. **Bertolotti-Ciarlet, A., L. J. White, R. Chen, B. V. Prasad, and M. K. Estes.** 2002. Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *J Virol* **76**:4044-55.
 29. **Bessa, J., N. Schmitz, H. J. Hinton, K. Schwarz, A. Jegerlehner, and M. F. Bachmann.** 2008. Efficient induction of mucosal and systemic immune responses by virus-like particles administered intranasally: implications for vaccine design. *Eur J Immunol* **38**:114-26.
 30. **Bhella, D., D. Gatherer, Y. Chaudhry, R. Pink, and I. G. Goodfellow.** 2008. Structural insights into calicivirus attachment and uncoating. *J Virol* **82**:8051-8.
 31. **Bhella, D., and I. G. Goodfellow.** 2011. The cryo-electron microscopy structure of feline calicivirus bound to junctional adhesion molecule A at 9-angstrom resolution reveals receptor-induced flexibility and two distinct conformational changes in the capsid protein VP1. *J Virol* **85**:11381-90.
 32. **Blanco, E., M. Garcia-Briones, A. Sanz-Parra, P. Gomes, E. De Oliveira, M. L. Valero, D. Andreu, V. Ley, and F. Sobrino.** 2001. Identification of T-cell epitopes in nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **75**:3164-74.
 33. **Boga, J. A., R. Casais, M. S. Marin, J. M. Martin-Alonso, R. S. Carmenes, M. Prieto, and F. Parra.** 1994. Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the capsid protein gene from rabbit haemorrhagic disease virus (Spanish isolate AST/89). *J Gen Virol* **75 (Pt 9)**:2409-13.
 34. **Boga, J. A., J. M. Martin Alonso, R. Casais, and F. Parra.** 1997. A single dose immunization with rabbit haemorrhagic disease virus major capsid protein produced in *Saccharomyces cerevisiae* induces protection. *J Gen Virol* **78 (Pt 9)**:2315-8.
 35. **Bouvier, N. M., and A. C. Lowen.** 2010. Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission. *Viruses* **2**:1530-1563.
 36. **Brun, A., J. Barcena, E. Blanco, B. Borrego, D. Dory, J. M. Escribano, G. Le Gall-Recule, J. Ortego, and L. K. Dixon.** 2011. Current strategies for subunit and genetic viral veterinary vaccine development. *Virus Res* **157**:1-12.
 37. **Buonaguro, L., M. Tagliamonte, M. L. Tornesello, and F. M. Buonaguro.** 2011. Developments in virus-like particle-based vaccines for infectious diseases and cancer. *Expert Rev Vaccines* **10**:1569-83.
 38. **Buonaguro, L., M. L. Tornesello, and F. M. Buonaguro.** 2010. Virus-like particles as particulate vaccines. *Curr HIV Res* **8**:299-309.

39. **Burroughs, J. N., and F. Brown.** 1974. Physico-chemical evidence for the re-classification of the caliciviruses. *J Gen Virol* **22**:281-6.
40. **Calvete, C., J. H. Calvo, and P. Sarto.** 2013. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in wild rabbits in Spain. *World Rabbit Sci* **21**:52-53.
41. **Capucci, L., P. Fusi, A. Lavazza, M. L. Pacciarini, and C. Rossi.** 1996. Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J Virol* **70**:8614-23.
42. **Caspar, D. L., and A. Klug.** 1962. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **27**:1-24.
43. **Castanon, S., M. S. Marin, J. M. Martin-Alonso, J. A. Boga, R. Casais, J. M. Humara, R. J. Ordas, and F. Parra.** 1999. Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol* **73**:4452-5.
44. **Caston, J. R., and J. L. Carrascosa.** 2013. The basic architecture of viruses. *Subcell Biochem* **68**:53-75.
45. **Clarke, I., M. Estes, K. Green, G. Hansman, N. Knowles, M. Koopmans, D. Matson, G. Meyers, J. Neill, A. Radford, A. Smith, M. Studdert, H.-J. Thiel, and J. Vinje.** 2012. Caliciviridae, p. 977–986. *In* A. King, M. Adams, E. Carstens, and E. Lefkowitz (ed.), *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, London.
46. **Cooke, B. D.** 2014. *Australia's War Against Rabbits: The Story of Rabbit Haemorrhagic Disease*. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.
47. **Cooke, B. D.** 2002. Rabbit haemorrhagic disease: field epidemiology and the management of wild rabbit populations. *Rev Sci Tech* **21**:347-58.
48. **Cottam, E. M., J. Wadsworth, A. E. Shaw, R. J. Rowlands, L. Goatley, S. Maan, N. S. Maan, P. P. Mertens, K. Ebert, Y. Li, E. D. Ryan, N. Juleff, N. P. Ferris, J. W. Wilesmith, D. T. Haydon, D. P. King, D. J. Paton, and N. J. Knowles.** 2008. Transmission pathways of foot-and-mouth disease virus in the United Kingdom in 2007. *PLoS Pathog* **4**:e1000050.
49. **Coyne, K. P., B. R. Jones, A. Kipar, J. Chantrey, C. J. Porter, P. J. Barber, S. Dawson, R. M. Gaskell, and A. D. Radford.** 2006. Lethal outbreak of disease associated with feline calicivirus infection in cats. *Vet Rec* **158**:544-50.
50. **Crisci, E., H. Almanza, I. Mena, L. Cordoba, E. Gomez-Casado, J. R. Caston, L. Fraile, J. Barcena, and M. Montoya.** 2009. Chimeric calicivirus-like particles elicit protective anti-viral cytotoxic responses without adjuvant. *Virology* **387**:303-12.
51. **Crisci, E., J. Barcena, and M. Montoya.** 2012. Virus-like particles: The new frontier of vaccines for animal viral infections. *Vet Immunol Immunopathol* **148**:211-25.
52. **Crisci, E., J. Barcena, and M. Montoya.** 2013. Virus-like particle-based vaccines for animal viral infections. *Inmunologia* **32**:102-116.
53. **Crisci, E., L. Fraile, N. Moreno, E. Blanco, R. Cabezon, C. Costa, T. Mussa, M. Baratelli, P. Martinez-Orellana, L. Ganges, J. Martinez, J. Barcena, and M. Montoya.** 2012. Chimeric calicivirus-like particles elicit specific immune responses in pigs. *Vaccine* **30**:2427-39.
54. **Crisci, E., L. Fraile, R. Novellas, Y. Espada, R. Cabezon, J. Martinez, L. Cordoba, J. Barcena, D. Benitez-Ribas, and M. Montoya.** 2015. In vivo tracking and immunological properties of pulsed porcine monocyte-derived dendritic cells. *Mol Immunol* **63**:343–354.
55. **Chackerian, B.** 2007. Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. *Expert Rev Vaccines* **6**:381-90.
56. **Chackerian, B., L. Briglio, P. S. Albert, D. R. Lowy, and J. T. Schiller.** 2004. Induction of autoantibodies to CCR5 in macaques and subsequent effects upon challenge with an R5-tropic simian/human immunodeficiency virus. *J Virol* **78**:4037-47.
57. **Chackerian, B., P. Lenz, D. R. Lowy, and J. T. Schiller.** 2002. Determinants of autoantibody induction by conjugated papillomavirus virus-like particles. *J Immunol* **169**:6120-6.

58. **Chackerian, B., D. R. Lowy, and J. T. Schiller.** 1999. Induction of autoantibodies to mouse CCR5 with recombinant papillomavirus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:2373-8.
59. **Cheetham, S., M. Souza, T. Meulia, S. Grimes, M. G. Han, and L. J. Saif.** 2006. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *J Virol* **80**:10372-81.
60. **Chen, R., J. D. Neill, M. K. Estes, and B. V. Prasad.** 2006. X-ray structure of a native calicivirus: structural insights into antigenic diversity and host specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:8048-53.
61. **Chen, R., J. D. Neill, J. S. Noel, A. M. Hutson, R. I. Glass, M. K. Estes, and B. V. Prasad.** 2004. Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications. *J Virol* **78**:6469-79.
62. **Chen, R., J. D. Neill, and B. V. Prasad.** 2003. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of San Miguel sea lion virus: an animal calicivirus. *J Struct Biol* **141**:143-8.
63. **Da Silva, D. M., D. V. Pastrana, J. T. Schiller, and W. M. Kast.** 2001. Effect of preexisting neutralizing antibodies on the anti-tumor immune response induced by chimeric human papillomavirus virus-like particle vaccines. *Virology* **290**:350-60.
64. **Dalsgaard, K., A. Uttenthal, T. D. Jones, F. Xu, A. Merryweather, W. D. Hamilton, J. P. Langeveld, R. S. Boshuizen, S. Kamstrup, G. P. Lomonossoff, C. Porta, C. Vela, J. I. Casal, R. H. Meloen, and P. B. Rodgers.** 1997. Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nat Biotechnol* **15**:248-52.
65. **Dalton, K. P., I. Nicieza, J. Abrantes, P. J. Esteves, and F. Parra.** 2014. Spread of new variant RHDV in domestic rabbits on the Iberian Peninsula. *Vet Microbiol* **169**:67-73.
66. **Dalton, K. P., I. Nicieza, A. Balseiro, M. A. Muguerza, J. M. Rosell, R. Casais, A. L. Alvarez, and F. Parra.** 2012. Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain. *Emerg Infect Dis* **18**:2009-12.
67. **Deng, L., K. J. Cho, W. Fiers, and X. Saelens.** 2015. M2e-Based Universal Influenza A Vaccines. *Vaccines (Basel)* **3**:105-36.
68. **Deng, Y., C. A. Batten, B. L. Liu, P. R. Lambden, M. Elschner, H. Gunther, P. Otto, P. Schnurch, W. Eichhorn, W. Herbst, and I. N. Clarke.** 2003. Studies of epidemiology and seroprevalence of bovine noroviruses in Germany. *J Clin Microbiol* **41**:2300-5.
69. **Di Martino, B., F. Marsilio, and P. Roy.** 2007. Assembly of feline calicivirus-like particle and its immunogenicity. *Vet Microbiol* **120**:173-8.
70. **Dintzis, R. Z., B. Vogelstein, and H. M. Dintzis.** 1982. Specific cellular stimulation in the primary immune response: experimental test of a quantized model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**:884-8.
71. **Dutta, A.** 2008. Epidemiology of poliomyelitis--options and update. *Vaccine* **26**:5767-73.
72. **Dyer, M. R., W. A. Renner, and M. F. Bachmann.** 2006. A second vaccine revolution for the new epidemics of the 21st century. *Drug Discov Today* **11**:1028-33.
73. **Ehresmann, D. W., and F. L. Schaffer.** 1977. RNA synthesized in calicivirus-infected cells is atypical of picornaviruses. *J Virol* **22**:572-6.
74. **El Bakkouri, K., F. Descamps, M. De Filette, A. Smet, E. Festjens, A. Birkett, N. Van Rooijen, S. Verbeek, W. Fiers, and X. Saelens.** 2011. Universal vaccine based on ectodomain of matrix protein 2 of influenza A: Fc receptors and alveolar macrophages mediate protection. *J Immunol* **186**:1022-31.
75. **El Mehdaoui, S., A. Touze, S. Laurent, P. Y. Sizaret, D. Rasschaert, and P. Coursaget.** 2000. Gene transfer using recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsids with genetically modified DNA encapsidation capacity by addition of packaging sequences from the L1 or L2 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol* **74**:10332-40.
76. **Eliasson, D. G., K. El Bakkouri, K. Schon, A. Ramne, E. Festjens, B. Lowenadler, W. Fiers, X. Saelens, and N. Lycke.** 2008. CTA1-M2e-DD: a novel mucosal adjuvant targeted influenza vaccine. *Vaccine* **26**:1243-52.

77. **Enioutina, E. Y., D. Visic, and R. A. Daynes.** 2000. The induction of systemic and mucosal immune responses to antigen-adjuvant compositions administered into the skin: alterations in the migratory properties of dendritic cells appears to be important for stimulating mucosal immunity. *Vaccine* **18**:2753-67.
78. **Farkas, T., S. Nakajima, M. Sugieda, X. Deng, W. Zhong, and X. Jiang.** 2005. Seroprevalence of noroviruses in swine. *J Clin Microbiol* **43**:657-61.
79. **Farkas, T., K. Sestak, C. Wei, and X. Jiang.** 2008. Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *J Virol* **82**:5408-16.
80. **Feng, J., M. Zhang, K. Mozdzanowska, D. Zharikova, H. Hoff, W. Wunner, R. B. Couch, and W. Gerhard.** 2006. Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2. *Virol J* **3**:102.
81. **Fenner, F., and B. Fantini.** 1999. *Biological Control of Vertebrate Pests. The history of Myxomatosis, an Experiment in Evolution.* CABI Publishing, Oxford, England.
82. **Fiers, W., M. De Filette, A. Birkett, S. Neiryck, and W. Min Jou.** 2004. A "universal" human influenza A vaccine. *Virus Res* **103**:173-6.
83. **Forrester, N. L., R. C. Trout, and E. A. Gould.** 2007. Benign circulation of rabbit haemorrhagic disease virus on Lambay Island, Eire. *Virology* **358**:18-22.
84. **Frietze, K. M., D. S. Peabody, and B. Chackerian.** 2016. Engineering virus-like particles as vaccine platforms. *Curr Opin Virol* **18**:44-49.
85. **Gallichan, W. S., and K. L. Rosenthal.** 1996. Long-lived cytotoxic T lymphocyte memory in mucosal tissues after mucosal but not systemic immunization. *J Exp Med* **184**:1879-90.
86. **Glass, P. J., L. J. White, J. M. Ball, I. Leparc-Goffart, M. E. Hardy, and M. K. Estes.** 2000. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol* **74**:6581-91.
87. **Glass, R. I., U. D. Parashar, and M. K. Estes.** 2009. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med* **361**:1776-85.
88. **Goodfellow, I.** 2012. Calicivirus Reverse Genetics, p. 91-112. *In* A. Bridgen (ed.), *Reverse Genetics of RNA Viruses: Applications and Perspectives.* John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
89. **Grgacic, E. V., and D. A. Anderson.** 2006. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods* **40**:60-5.
90. **Guerrero, R. A., J. M. Ball, S. S. Krater, S. E. Pacheco, J. D. Clements, and M. K. Estes.** 2001. Recombinant Norwalk virus-like particles administered intranasally to mice induce systemic and mucosal (fecal and vaginal) immune responses. *J Virol* **75**:9713-22.
91. **Guo, M., J. F. Evermann, and L. J. Saif.** 2001. Detection and molecular characterization of cultivable caliciviruses from clinically normal mink and enteric caliciviruses associated with diarrhea in mink. *Arch Virol* **146**:479-93.
92. **Hansman, G. S., X. J. Jiang, and K. Y. Green.** 2010. *Caliciviruses. Molecular and cellular virology.* Caister Academic Press, Norwich, United Kingdom.
93. **Hansman, G. S., K. Natori, H. Shirato-Horikoshi, S. Ogawa, T. Oka, K. Katayama, T. Tanaka, T. Miyoshi, K. Sakae, S. Kobayashi, M. Shinohara, K. Uchida, N. Sakurai, K. Shinozaki, M. Okada, Y. Seto, K. Kamata, N. Nagata, K. Tanaka, T. Miyamura, and N. Takeda.** 2006. Genetic and antigenic diversity among noroviruses. *J Gen Virol* **87**:909-19.
94. **Hansman, G. S., T. Oka, K. Katayama, and N. Takeda.** 2007. Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Rev Med Virol* **17**:133-41.
95. **Hashemi, H., S. Pouyanfard, M. Bandehpour, Z. Noroozbabaei, B. Kazemi, X. Saelens, and T. Mokhtari-Azad.** 2012. Immunization with M2e-displaying T7 bacteriophage nanoparticles protects against influenza A virus challenge. *PLoS One* **7**:e45765.
96. **Herbert, T. P., I. Brierley, and T. D. Brown.** 1996. Detection of the ORF3 polypeptide of feline calicivirus in infected cells and evidence for its expression from a single, functionally bicistronic, subgenomic mRNA. *J Gen Virol* **77 (Pt 1)**:123-7.

97. **Hitchman, R. B., R. D. Possee, A. T. Crombie, A. Chambers, K. Ho, E. Siaterli, O. Lissina, H. Sternard, R. Novy, K. Loomis, L. E. Bird, R. J. Owens, and L. A. King.** 2010. Genetic modification of a baculovirus vector for increased expression in insect cells. *Cell Biology and Toxicology* **26**:57-68.
98. **Ionescu, R. M., C. T. Przysiecki, X. Liang, V. M. Garsky, J. Fan, B. Wang, R. Troutman, Y. Rippeon, E. Flanagan, J. Shiver, and L. Shi.** 2006. Pharmaceutical and immunological evaluation of human papillomavirus viruslike particle as an antigen carrier. *J Pharm Sci* **95**:70-9.
99. **Jahnke, M., E. C. Holmes, P. J. Kerr, J. D. Wright, and T. Strive.** 2010. Evolution and phylogeography of the nonpathogenic calicivirus RCV-A1 in wild rabbits in Australia. *J Virol* **84**:12397-404.
100. **Jansen, K. U., M. E. Conner, and M. K. Estes.** 2009. Virus-like particles as vaccines and vaccine delivery systems, p. 298-305. *In* M. M. Levine, G. Dougan, M. F. Good, M. A. Liu, G. J. Nabel, J. P. Nataro, and R. Rapuoli (ed.), *New generation vaccines*, 4th Edition ed. Informa Healthcare.
101. **Jegerlehner, A., N. Schmitz, T. Storni, and M. F. Bachmann.** 2004. Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J Immunol* **172**:5598-605.
102. **Jegerlehner, A., T. Storni, G. Lipowsky, M. Schmid, P. Pumpens, and M. F. Bachmann.** 2002. Regulation of IgG antibody responses by epitope density and CD21-mediated costimulation. *Eur J Immunol* **32**:3305-14.
103. **Jegerlehner, A., A. Tissot, F. Lechner, P. Sebbel, I. Erdmann, T. Kundig, T. Bachi, T. Storni, G. Jennings, P. Pumpens, W. A. Renner, and M. F. Bachmann.** 2002. A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses. *Vaccine* **20**:3104-12.
104. **Jennings, G. T., and M. F. Bachmann.** 2008. The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol Chem* **389**:521-536.
105. **Jennings, G. T., and M. F. Bachmann.** 2009. Immunodrugs: therapeutic VLP-based vaccines for chronic diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **49**:303-26.
106. **Jiang, X., M. Wang, D. Y. Graham, and M. K. Estes.** 1992. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* **66**:6527-32.
107. **Jiang, X., W. Zhong, M. Kaplan, L. K. Pickering, and D. O. Matson.** 1999. Expression and characterization of Sapporo-like human calicivirus capsid proteins in baculovirus. *J Virol Methods* **78**:81-91.
108. **Johnson, J. E.** 2008. Multi-disciplinary studies of viruses: the role of structure in shaping the questions and answers. *J Struct Biol* **163**:246-53.
109. **Johnson, J. E., and W. Chiu.** 2000. Structures of virus and virus-like particles. *Curr Opin Struct Biol* **10**:229-35.
110. **Joshi, H., K. Lewis, A. Singharoy, and P. J. Ortoleva.** 2013. Epitope engineering and molecular metrics of immunogenicity: a computational approach to VLP-based vaccine design. *Vaccine* **31**:4841-7.
111. **Kaplon, J., E. Guenau, P. Asdrubal, P. Pothier, and K. Ambert-Balay.** 2011. Possible novel nebovirus genotype in cattle, France. *Emerg Infect Dis* **17**:1120-3.
112. **Karst, S. M., C. E. Wobus, I. G. Goodfellow, K. Y. Green, and H. W. Virgin.** 2014. Advances in Norovirus Biology. *Cell Host Microbe* **15**:668-680.
113. **Katpally, U., N. R. Voss, T. Cavazza, S. Taube, J. R. Rubin, V. L. Young, J. Stuckey, V. K. Ward, H. W. t. Virgin, C. E. Wobus, and T. J. Smith.** 2010. High-resolution cryo-electron microscopy structures of murine norovirus 1 and rabbit hemorrhagic disease virus reveal marked flexibility in the receptor binding domains. *J Virol* **84**:5836-41.

114. **Katpally, U., C. E. Wobus, K. Dryden, H. W. t. Virgin, and T. J. Smith.** 2008. Structure of antibody-neutralized murine norovirus and unexpected differences from viruslike particles. *J Virol* **82**:2079-88.
115. **Kerr, P. J., J. Hone, L. Perrin, N. French, and C. K. Williams.** 2009. Molecular and serological analysis of the epidemiology of myxoma virus in rabbits. *Vet Microbiol* **143**:167-78.
116. **Kolawole, A. O., M. Li, C. Xia, A. E. Fischer, N. S. Giacobbi, C. M. Rippinger, J. B. Proescher, S. K. Wu, S. L. Bessling, M. Gamez, C. Yu, R. Zhang, T. S. Mehoke, J. M. Pipas, J. T. Wolfe, J. S. Lin, A. B. Feldman, T. J. Smith, and C. E. Wobus.** 2014. Flexibility in surface-exposed loops in a virus capsid mediates escape from antibody neutralization. *J Virol* **88**:4543-57.
117. **Kong, D., J. Liu, Q. Jiang, Z. Yu, X. Hu, D. Guo, Q. Huang, M. Jiao, and L. Qu.** 2016. Production, Characterization, and Epitope Mapping of Monoclonal Antibodies Against Different Subtypes of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV). *Sci Rep* **6**:20857.
118. **Koo, H. L., N. Ajami, R. L. Atmar, and H. L. DuPont.** 2010. Noroviruses: The leading cause of gastroenteritis worldwide. *Discov Med* **10**:61-70.
119. **Koudelka, K. J., A. S. Pitek, M. Manchester, and N. F. Steinmetz.** 2015. Virus-Based Nanoparticles as Versatile Nanomachines. *Annu Rev Virol* **2**:379-401.
120. **Kozak, M.** 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* **15**:8125-48.
121. **Kushnir, N., S. J. Streatfield, and V. Yusibov.** 2012. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine* **31**:58-83.
122. **L'Homme, Y., R. Sansregret, E. Plante-Fortier, A. M. Lamontagne, M. Ouardani, G. Lacroix, and C. Simard.** 2009. Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae. *Virus Genes* **39**:66-75.
123. **Lamb, R. A., S. L. Zebedee, and C. D. Richardson.** 1985. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface. *Cell* **40**:627-33.
124. **Laurent, S., J. F. Vautherot, M. F. Madelaine, G. Le Gall, and D. Rasschaert.** 1994. Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection. *J Virol* **68**:6794-8.
125. **Le Gall-Recule, G., A. Lavazza, S. Marchandeau, S. Bertagnoli, F. Zwingelstein, P. Cavadini, N. Martinelli, G. Lombardi, J. L. Guerin, E. Lemaitre, A. Decors, S. Boucher, B. Le Normand, and L. Capucci.** 2013. Emergence of a new lagovirus related to Rabbit Haemorrhagic Disease Virus. *Vet Res* **44**:81.
126. **Le Gall-Recule, G., F. Zwingelstein, S. Boucher, B. Le Normand, G. Plassiart, Y. Portejoie, A. Decors, S. Bertagnoli, J. L. Guerin, and S. Marchandeau.** 2011. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet Rec* **168**:137-8.
127. **Le Gall-Recule, G., F. Zwingelstein, M. P. Fages, S. Bertagnoli, J. Gelfi, J. Aubineau, A. Roobrouck, G. Botti, A. Lavazza, and S. Marchandeau.** 2011. Characterisation of a non-pathogenic and non-protective infectious rabbit lagovirus related to RHDV. *Virology* **410**:395-402.
128. **Lee, K. L., R. M. Twyman, S. Fiering, and N. F. Steinmetz.** 2016. Virus-based nanoparticles as platform technologies for modern vaccines. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*.
129. **Li, K., A. Peers-Adams, S. J. Win, S. Scullion, M. Wilson, V. L. Young, P. Jennings, V. K. Ward, M. A. Baird, and S. L. Young.** 2013. Antigen incorporated in virus-like particles is delivered to specific dendritic cell subsets that induce an effective antitumor immune response in vivo. *J Immunother* **36**:11-9.
130. **Liao, Q., X. Wang, D. Wang, and D. Zhang.** 2014. Complete genome sequence of a novel calicivirus from a goose. *Arch Virol*.
131. **Lindesmith, L. C., E. F. Donaldson, M. Beltramello, S. Pintus, D. Corti, J. Swanstrom, K. Debbink, T. A. Jones, A. Lanzavecchia, and R. S. Baric.** 2014. Particle Conformation

- Regulates Antibody Access to a Conserved GII.4 Norovirus Blockade Epitope. *J Virol* **88**:8826-42.
132. **Liu, F., X. Wu, L. Li, S. Ge, Z. Liu, and Z. Wang.** 2013. Virus-like particles: promising platforms with characteristics of DIVA for veterinary vaccine design. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **36**:343-52.
 133. **Liu, S. J., H. P. Xue, B. Q. Pu, and N. H. Qian.** 1984. A new viral disease in rabbit. *Anim Husb Vet Med* **16**:253-255.
 134. **Liu, W., and Y. H. Chen.** 2005. High epitope density in a single protein molecule significantly enhances antigenicity as well as immunogenicity: a novel strategy for modern vaccine development and a preliminary investigation about B cell discrimination of monomeric proteins. *Eur J Immunol* **35**:505-14.
 135. **Lochridge, V. P., and M. E. Hardy.** 2007. A single-amino-acid substitution in the P2 domain of VP1 of murine norovirus is sufficient for escape from antibody neutralization. *J Virol* **81**:12316-22.
 136. **Lopez-Vidal, J., S. Gomez-Sebastian, J. Barcena, C. Nunez Mdel, D. Martinez-Alonso, B. Dudognon, E. Guijarro, and J. M. Escribano.** 2015. Improved Production Efficiency of Virus-Like Particles by the Baculovirus Expression Vector System. *PLoS One* **10**:e0140039.
 137. **Lopman, B., M. Zambon, and D. W. Brown.** 2008. The evolution of norovirus, the "gastric flu". *PLoS Med* **5**:e42.
 138. **Lorena Gutierrez-Escolano, A.** 2014. Host-cell factors involved in the calicivirus replicative cycle. *Future Virology* **9**:147-160.
 139. **Luque, D., J. M. Gonzalez, J. Gomez-Blanco, R. Marabini, J. Chichon, I. Mena, I. Angulo, J. L. Carrascosa, N. Verdager, B. L. Trus, J. Barcena, and J. R. Caston.** 2012. Epitope insertion at the N-terminal molecular switch of the rabbit hemorrhagic disease virus T = 3 capsid protein leads to larger T = 4 capsids. *J Virol* **86**:6470-80.
 140. **Luque, D., I. Saugar, J. F. Rodriguez, N. Verdager, D. Garriga, C. S. Martin, J. A. Velazquez-Muriel, B. L. Trus, J. L. Carrascosa, and J. R. Caston.** 2007. Infectious bursal disease virus capsid assembly and maturation by structural rearrangements of a transient molecular switch. *J Virol* **81**:6869-78.
 141. **Luttermann, C., and G. Meyers.** 2010. Feline Calicivirus, p. 145-168. *In* G. S. Hansman, X. J. Jiang, and K. Y. Green (ed.), *Caliciviruses. Molecular and cellular virology*. Caister Academic Press, Norwich, United Kingdom.
 142. **Marin, M. S., J. M. Martin Alonso, L. I. Perez Ordoyo Garcia, J. A. Boga, J. L. Arguello-Villares, R. Casais, K. Venugopal, W. Jiang, E. A. Gould, and F. Parra.** 1995. Immunogenic properties of rabbit haemorrhagic disease virus structural protein VP60 expressed by a recombinant baculovirus: an efficient vaccine. *Virus Res* **39**:119-28.
 143. **Martella, V., M. Campolo, E. Lorusso, P. Cavicchio, M. Camero, A. L. Bellacicco, N. Decaro, G. Elia, G. Greco, M. Corrente, C. Desario, S. Arista, K. Banyai, M. Koopmans, and C. Buonavoglia.** 2007. Norovirus in captive lion cub (*Panthera leo*). *Emerg Infect Dis* **13**:1071-3.
 144. **Martella, V., E. Lorusso, N. Decaro, G. Elia, A. Radogna, M. D'Abramo, C. Desario, A. Cavalli, M. Corrente, M. Camero, C. A. Germinario, K. Banyai, B. Di Martino, F. Marsilio, L. E. Carmichael, and C. Buonavoglia.** 2008. Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerg Infect Dis* **14**:1306-8.
 145. **Mateu, M. G.** 1995. Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res* **38**:1-24.
 146. **Mateu, M. G.** 2013. Assembly, stability and dynamics of virus capsids. *Arch Biochem Biophys* **531**:65-79.
 147. **Mateu, M. G.** 2013. Introduction: the structural basis of virus function. *Subcell Biochem* **68**:3-51.

148. **Mateu, M. G.** 2011. Virus engineering: functionalization and stabilization. *Protein Eng Des Sel* **24**:53-63.
149. **Mauroy, A., A. Scipioni, E. Mathijs, C. Miry, D. Ziant, C. Thys, and E. Thiry.** 2008. Noroviruses and sapoviruses in pigs in Belgium. *Arch Virol* **153**:1927-31.
150. **Mesquita, J. R., L. Barclay, M. S. Nascimento, and J. Vinje.** 2010. Novel norovirus in dogs with diarrhea. *Emerg Infect Dis* **16**:980-2.
151. **Meyers, G.** 2007. Characterization of the sequence element directing translation reinitiation in RNA of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol* **81**:9623-32.
152. **Meyers, G.** 2003. Translation of the minor capsid protein of a calicivirus is initiated by a novel termination-dependent reinitiation mechanism. *J Biol Chem* **278**:34051-60.
153. **Meyers, G., C. Wirblich, and H. J. Thiel.** 1991. Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. *Virology* **184**:677-86.
154. **Mikalsen, A. B., P. Nilsen, M. Froystad-Saugen, K. Lindmo, T. M. Eliassen, M. Rode, and O. Evensen.** 2014. Characterization of a novel calicivirus causing systemic infection in atlantic salmon (*Salmo salar* L.): proposal for a new genus of caliciviridae. *PLoS One* **9**:e107132.
155. **Milton, I. D., J. Turner, A. Teelan, R. Gaskell, P. C. Turner, and M. J. Carter.** 1992. Location of monoclonal antibody binding sites in the capsid protein of feline calicivirus. *J Gen Virol* **73** (Pt 9):2435-9.
156. **Moyle, P. M., and I. Toth.** 2013. Modern subunit vaccines: development, components, and research opportunities. *ChemMedChem* **8**:360-76.
157. **Mozdzanowska, K., D. Zharikova, M. Cudic, L. Otvos, and W. Gerhard.** 2007. Roles of adjuvant and route of vaccination in antibody response and protection engendered by a synthetic matrix protein 2-based influenza A virus vaccine in the mouse. *Virol J* **4**:118.
158. **Mutze, G., R. Sinclair, D. Peacock, J. Kovaliski, and L. Capucci.** 2010. Does a benign calicivirus reduce the effectiveness of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in Australia? Experimental evidence from field releases of RHDV on bait. *Wildlife Research* **37**:311-319.
159. **Nagesha, H. S., L. F. Wang, and A. D. Hyatt.** 1999. Virus-like particles of calicivirus as epitope carriers. *Arch Virol* **144**:2429-39.
160. **Nagesha, H. S., L. F. Wang, A. D. Hyatt, C. J. Morrissy, C. Lenghaus, and H. A. Westbury.** 1995. Self-assembly, antigenicity, and immunogenicity of the rabbit haemorrhagic disease virus (Czechoslovakian strain V-351) capsid protein expressed in baculovirus. *Arch Virol* **140**:1095-1108.
161. **Neill, J. D., R. F. Meyer, and B. S. Seal.** 1995. Genetic relatedness of the caliciviruses: San Miguel sea lion and vesicular exanthema of swine viruses constitute a single genotype within the Caliciviridae. *J Virol* **69**:4484-8.
162. **Neill, J. D., S. V. Sosnovtsev, and K. Y. Green.** 2000. Recovery and altered neutralization specificities of chimeric viruses containing capsid protein domain exchanges from antigenically distinct strains of feline calicivirus. *J Virol* **74**:1079-84.
163. **Neiryck, S., T. Deroo, X. Saelens, P. Vanlandschoot, W. M. Jou, and W. Fiers.** 1999. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med* **5**:1157-63.
164. **Ng, T. F., R. Marine, C. Wang, P. Simmonds, B. Kapusinszky, L. Bodhidatta, B. S. Oderinde, K. E. Wommack, and E. Delwart.** 2012. High variety of known and new RNA and DNA viruses of diverse origins in untreated sewage. *J Virol* **86**:12161-75.
165. **Noad, R., and P. Roy.** 2013. Virus-like particles, p. 167-186. *In* B. H. A. Rehm (ed.), *Bionanotechnology: Biological Self-assembly and its Applications*. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
166. **Ohlinger, V. F., B. Haas, G. Meyers, F. Weiland, and H. J. Thiel.** 1990. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J Virol* **64**:3331-6.

167. **Oksanen, H., M. Pietilä, A. Sencilo, N. Atanasova, E. Roine, and D. Bamford.** 2012. Virus Universe: Can It Be Constructed from a Limited Number of Viral Architectures, p. 83-105. *In* G. Witzany (ed.), *Viruses: Essential Agents of Life*. Springer Netherlands.
168. **Oliver, S. L., E. Asobayire, A. M. Dastjerdi, and J. C. Bridger.** 2006. Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae. *Virology* **350**:240-50.
169. **Oliver, S. L., A. M. Dastjerdi, S. Wong, L. El-Attar, C. Gallimore, D. W. Brown, J. Green, and J. C. Bridger.** 2003. Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *J Virol* **77**:2789-98.
170. **Ossiboff, R. J., Y. Zhou, P. J. Lightfoot, B. V. Prasad, and J. S. Parker.** 2010. Conformational changes in the capsid of a calicivirus upon interaction with its functional receptor. *J Virol* **84**:5550-64.
171. **Palucha, A., A. Loniewska, S. Satheshkumar, A. M. Boguszewska-Chachulska, M. Umashankar, M. Milner, A. L. Haenni, and H. S. Savithri.** 2005. Virus-like particles: models for assembly studies and foreign epitope carriers. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **80**:135-68.
172. **Pascual, E., C. P. Mata, J. Gomez-Blanco, N. Moreno, J. Barcena, E. Blanco, A. Rodriguez-Frandsen, A. Nieto, J. L. Carrascosa, and J. R. Caston.** 2015. Structural basis for the development of avian virus capsids that display influenza virus proteins and induce protective immunity. *J Virol* **89**:2563-74.
173. **Patel, M. M., A. J. Hall, J. Vinje, and U. D. Parashar.** 2009. Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol* **44**:1-8.
174. **Peacey, M., S. Wilson, R. Perret, F. Ronchese, V. K. Ward, V. Young, S. L. Young, and M. A. Baird.** 2008. Virus-like particles from rabbit hemorrhagic disease virus can induce an anti-tumor response. *Vaccine* **26**:5334-7.
175. **Pedersen, N. C., J. B. Elliott, A. Glasgow, A. Poland, and K. Keel.** 2000. An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus. *Vet Microbiol* **73**:281-300.
176. **Perez-Filgueira, D. M., P. Resino-Talavan, C. Cubillos, I. Angulo, M. G. Barderas, J. Barcena, and J. M. Escribano.** 2007. Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV. *Virology* **364**:422-30.
177. **Pesavento, P. A., K. O. Chang, and J. S. Parker.** 2008. Molecular virology of feline calicivirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **38**:775-86, vii.
178. **Plana-Duran, J., M. Bastons, M. J. Rodriguez, I. Climent, E. Cortes, C. Vela, and I. Casal.** 1996. Oral immunization of rabbits with VP60 particles confers protection against rabbit hemorrhagic disease. *Arch Virol* **141**:1423-36.
179. **Plotkin, S. A.** 2005. Vaccines: past, present and future. *Nat Med* **11**:S5-11.
180. **Plummer, E. M., and M. Manchester.** 2011. Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **3**:174-196.
181. **Poland, G. A., J. A. Whitaker, C. M. Poland, I. G. Ovsyannikova, and R. B. Kennedy.** 2016. Vaccinology in the third millennium: scientific and social challenges. *Curr Opin Virol* **17**:116-25.
182. **Possee, R. D., R. B. Hitchman, K. S. Richards, S. G. Mann, E. Siaterli, C. P. Nixon, H. Irving, R. Assenberg, D. Alderton, R. J. Owens, and L. A. King.** 2008. Generation of Baculovirus Vectors for the High-Throughput Production of Proteins in Insect Cells. *Biotechnology and Bioengineering* **101**:1115-1122.
183. **Prasad, B. V., M. E. Hardy, T. Dokland, J. Bella, M. G. Rossmann, and M. K. Estes.** 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* **286**:287-90.
184. **Prasad, B. V., R. Rothnagel, X. Jiang, and M. K. Estes.** 1994. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J Virol* **68**:5117-25.

185. **Prasad, B. V., and M. F. Schmid.** 2012. Principles of virus structural organization. *Adv Exp Med Biol* **726**:17-47.
186. **Price, G. E., C. Y. Lo, J. A. Mispelon, and S. L. Epstein.** 2014. Mucosal immunization with a candidate universal influenza vaccine reduces virus transmission in a mouse model. *J Virol* **88**:6019-30.
187. **Puggioni, G., P. Cavadini, C. Maestrale, R. Scivoli, G. Botti, C. Ligios, G. Le Gall-Recule, A. Lavazza, and L. Capucci.** 2013. The new French 2010 Rabbit Hemorrhagic Disease Virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). *Vet Res* **44**:96.
188. **Pushko, P., P. Pumpens, and E. Grens.** 2013. Development of virus-like particle technology from small highly symmetric to large complex virus-like particle structures. *Intervirology* **56**:141-65.
189. **Radford, A. D., K. P. Coyne, S. Dawson, C. J. Porter, and R. M. Gaskell.** 2007. Feline calicivirus. *Vet Res* **38**:319-35.
190. **Radford, A. D., S. Dawson, R. M. Gaskell, J. Foley, K. Hurley, and N. C. Pedersen.** 2002. Haemorrhagic fever, oedema and high mortality associated with FCV infection. *Vet Rec* **151**:155.
191. **Radford, A. D., K. Willoughby, S. Dawson, C. McCracken, and R. M. Gaskell.** 1999. The capsid gene of feline calicivirus contains linear B-cell epitopes in both variable and conserved regions. *J Virol* **73**:8496-502.
192. **Reynolds, B. S., H. Poulet, J. L. Pingret, D. Jas, S. Brunet, C. Lemeter, M. Etievant, and C. Boucraut-Baralon.** 2009. A nosocomial outbreak of feline calicivirus associated virulent systemic disease in France. *J Feline Med Surg*.
193. **Rodak, L., B. Smid, L. Valicek, T. Vesely, J. Stepanek, J. Hampl, and E. Jurak.** 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus and determination of its major structural proteins. *J Gen Virol* **71 (Pt 5)**:1075-80.
194. **Rogan, D., and L. A. Babiuk.** 2005. Novel vaccines from biotechnology. *Rev Sci Tech* **24**:159-74.
195. **Rohayem, J., M. Bergmann, J. Gebhardt, E. Gould, P. Tucker, A. Mattevi, T. Unge, R. Hilgenfeld, and J. Neyts.** 2010. Antiviral strategies to control calicivirus infections. *Antiviral Res* **87**:162-78.
196. **Roldao, A., M. C. Mellado, L. R. Castilho, M. J. Carrondo, and P. M. Alves.** 2010. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccines* **9**:1149-76.
197. **Roldao, A., A. C. Silva, M. C. M. Mellado, P. M. Alves, and M. J. T. Carrondo.** 2011. Viruses and Virus-Like Particles in Biotechnology: Fundamentals and Applications, p. 625-649. *In* Moo-Young (ed.), *Comprehensive Biotechnology (2nd Edition), Volume 1: Scientific Fundamentals in Biotechnology*. Elsevier/Pergamon, Oxford, UK.
198. **Rossmann, M. G.** 2013. Structure of viruses: a short history. *Quarterly Reviews of Biophysics* **46**:133-180.
199. **Rotzschke, O., K. Falk, S. Stevanovic, G. Jung, P. Walden, and H. G. Rammensee.** 1991. Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur J Immunol* **21**:2891-4.
200. **Roy, P., and R. Noad.** 2009. Virus-like particles as a vaccine delivery system: myths and facts. *Adv Exp Med Biol* **655**:145-58.
201. **Sabin, A. B.** 1985. Oral poliovirus vaccine: history of its development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the world. *J Infect Dis* **151**:420-36.
202. **Salk, J., and D. Salk.** 1977. Control of influenza and poliomyelitis with killed virus vaccines. *Science* **195**:834-47.
203. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
204. **Scipioni, A., A. Mauroy, J. Vinje, and E. Thiry.** 2008. Animal noroviruses. *Vet J* **178**:32-45.

205. **Schaffer, F. L., H. L. Bachrach, F. Brown, J. H. Gillespie, J. N. Burroughs, S. H. Madin, C. R. Madeley, R. C. Povey, F. Scott, A. W. Smith, and M. J. Studdert.** 1980. Caliciviridae. *Intervirology* **14**:1-6.
206. **Scherpenisse, M., M. Mollers, R. M. Schepp, H. J. Boot, C. J. Meijer, G. A. Berbers, F. R. van der Klis, and H. E. de Melker.** 2012. Changes in antibody seroprevalence of seven high-risk HPV types between nationwide surveillance studies from 1995-96 and 2006-07 in The Netherlands. *PLoS One* **7**:e48807.
207. **Schmidt, N. W., A. Mishra, J. Wang, W. F. DeGrado, and G. C. Wong.** 2013. Influenza virus A M2 protein generates negative Gaussian membrane curvature necessary for budding and scission. *J Am Chem Soc* **135**:13710-9.
208. **Schwarz, B., and T. Douglas.** 2015. Development of virus-like particles for diagnostic and prophylactic biomedical applications. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **7**:722-35.
209. **Shanker, S., R. Czako, B. Sankaran, R. L. Atmar, M. K. Estes, and B. V. Prasad.** 2014. Structural analysis of determinants of histo-blood group antigen binding specificity in genogroup I noroviruses. *J Virol* **88**:6168-80.
210. **Shim, B. S., Y. K. Choi, C. H. Yun, E. G. Lee, Y. S. Jeon, S. M. Park, I. S. Cheon, D. H. Joo, C. H. Cho, M. S. Song, S. U. Seo, Y. H. Byun, H. J. Park, H. Poo, B. L. Seong, J. O. Kim, H. H. Nguyen, K. Stadler, D. W. Kim, K. J. Hong, C. Czerkinsky, and M. K. Song.** 2011. Sublingual immunization with M2-based vaccine induces broad protective immunity against influenza. *PLoS One* **6**:e27953.
211. **Smith, A. W., D. E. Skilling, N. Cherry, J. H. Mead, and D. O. Matson.** 1998. Calicivirus emergence from ocean reservoirs: zoonotic and interspecies movements. *Emerg Infect Dis* **4**:13-20.
212. **Smith, D. M., J. K. Simon, and J. R. Baker, Jr.** 2013. Applications of nanotechnology for immunology. *Nat Rev Immunol* **13**:592-605.
213. **Smith, T. J.** 2011. Structural studies on antibody recognition and neutralization of viruses. *Curr Opin Virol* **1**:150-6.
214. **Sosnovtsev, S., and K. Y. Green.** 1995. RNA transcripts derived from a cloned full-length copy of the feline calicivirus genome do not require VpG for infectivity. *Virology* **210**:383-90.
215. **Sosnovtsev, S. V., and K. Y. Green.** 2000. Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology* **277**:193-203.
216. **Spohn, G., and M. F. Bachmann.** 2008. Exploiting viral properties for the rational design of modern vaccines. *Expert Rev Vaccines* **7**:43-54.
217. **Steinmetz, N. F., T. Lin, G. P. Lomonosoff, and J. E. Johnson.** 2009. Structure-based engineering of an icosahedral virus for nanomedicine and nanotechnology. *Curr Top Microbiol Immunol* **327**:23-58.
218. **Steinmetz, N. F., and M. Manchester.** 2011. *Viral Nanoparticles - tools for materials science and biomedicine.* Pan Stanford Publishing, Singapore.
219. **Strive, T., J. Wright, J. Kovaliski, G. Botti, and L. Capucci.** 2010. The non-pathogenic Australian lagovirus RCV-A1 causes a prolonged infection and elicits partial cross-protection to rabbit haemorrhagic disease virus. *Virology* **398**:125-34.
220. **Strive, T., J. D. Wright, and A. J. Robinson.** 2009. Identification and partial characterisation of a new Lagovirus in Australian wild rabbits. *Virology* **384**:97-105.
221. **Sugieda, M., H. Nagaoka, Y. Kakishima, T. Ohshita, S. Nakamura, and S. Nakajima.** 1998. Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch Virol* **143**:1215-21.
222. **Svraka, S., H. Vennema, B. van der Veer, K. O. Hedlund, M. Thorhagen, J. Siebenga, E. Duizer, and M. Koopmans.** 2010. Epidemiology and genotype analysis of emerging sapovirus-associated infections across Europe. *J Clin Microbiol* **48**:2191-8.

223. **Tamura, S. I., H. Asanuma, Y. Ito, Y. Hirabayashi, Y. Suzuki, T. Nagamine, C. Aizawa, T. Kurata, and A. Oya.** 1992. Superior cross-protective effect of nasal vaccination to subcutaneous inoculation with influenza hemagglutinin vaccine. *Eur J Immunol* **22**:477-81.
224. **Tan, M., P. Huang, M. Xia, P. A. Fang, W. Zhong, M. McNeal, C. Wei, W. Jiang, and X. Jiang.** 2011. Norovirus P particle, a novel platform for vaccine development and antibody production. *J Virol* **85**:753-64.
225. **Taube, S., J. R. Rubin, U. Katpally, T. J. Smith, A. Kendall, J. A. Stuckey, and C. E. Wobus.** 2010. High-resolution x-ray structure and functional analysis of the murine norovirus 1 capsid protein protruding domain. *J Virol* **84**:5695-705.
226. **Taylor, K. M., T. Lin, C. Porta, A. G. Mosser, H. A. Giesing, G. P. Lomonossoff, and J. E. Johnson.** 2000. Influence of three-dimensional structure on the immunogenicity of a peptide expressed on the surface of a plant virus. *J Mol Recognit* **13**:71-82.
227. **Thorne, L. G., and I. G. Goodfellow.** 2014. Norovirus gene expression and replication. *J Gen Virol* **95**:278-91.
228. **Tissot, A. C., R. Renhofa, N. Schmitz, I. Cielens, E. Meijerink, V. Ose, G. T. Jennings, P. Saudan, P. Pumpens, and M. F. Bachmann.** 2010. Versatile virus-like particle carrier for epitope based vaccines. *PLoS One* **5**:e9809.
229. **Tohya, Y., N. Yokoyama, K. Maeda, Y. Kawaguchi, and T. Mikami.** 1997. Mapping of antigenic sites involved in neutralization on the capsid protein of feline calicivirus. *J Gen Virol* **78 (Pt 2)**:303-5.
230. **Tompkins, S. M., Z. S. Zhao, C. Y. Lo, J. A. Misplon, T. Liu, Z. Ye, R. J. Hogan, Z. Wu, K. A. Benton, T. M. Tumpey, and S. L. Epstein.** 2007. Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1. *Emerg Infect Dis* **13**:426-35.
231. **Torres, J. M., M. A. Ramirez, M. Morales, J. Barcena, B. Vazquez, E. Espuna, A. Pages-Mante, and J. M. Sanchez-Vizcaino.** 2000. Safety evaluation of a recombinant myxoma-RHDV virus inducing horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease. *Vaccine* **19**:174-82.
232. **Torres, J. M., C. Sanchez, M. A. Ramirez, M. Morales, J. Barcena, J. Ferrer, E. Espuna, A. Pages-Mante, and J. M. Sanchez-Vizcaino.** 2001. First field trial of a transmissible recombinant vaccine against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease. *Vaccine* **19**:4536-43.
233. **Touze, A., and P. Coursaget.** 1998. In vitro gene transfer using human papillomavirus-like particles. *Nucleic Acids Res* **26**:1317-23.
234. **Turnquist, S. E., and E. Ostlund.** 1997. Calicivirus outbreak with high mortality in a Missouri feline colony. *J Vet Diagn Invest* **9**:195-8.
235. **Vacher, G., M. D. Kaeser, C. Moser, R. Gurny, and G. Borchard.** 2013. Recent advances in mucosal immunization using virus-like particles. *Mol Pharm* **10**:1596-609.
236. **van Der Poel, W. H., J. Vinje, R. van Der Heide, M. I. Herrera, A. Vivo, and M. P. Koopmans.** 2000. Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerg Infect Dis* **6**:36-41.
237. **Wang, Q. H., M. G. Han, S. Cheetham, M. Souza, J. A. Funk, and L. J. Saif.** 2005. Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg Infect Dis* **11**:1874-81.
238. **Wang, Q. H., M. G. Han, J. A. Funk, G. Bowman, D. A. Janies, and L. J. Saif.** 2005. Genetic diversity and recombination of porcine sapoviruses. *J Clin Microbiol* **43**:5963-72.
239. **Wang, R., A. Song, J. Levin, D. Dennis, N. J. Zhang, H. Yoshida, L. Koriazova, L. Madura, L. Shapiro, A. Matsumoto, T. Mikayama, R. T. Kubo, S. Sarawar, H. Cheroutre, and S. Kato.** 2008. Therapeutic potential of a fully human monoclonal antibody against influenza A virus M2 protein. *Antiviral Res* **80**:168-77.
240. **Wang, X., F. Xu, J. Liu, B. Gao, Y. Liu, Y. Zhai, J. Ma, K. Zhang, T. S. Baker, K. Schulten, D. Zheng, H. Pang, and F. Sun.** 2013. Atomic model of rabbit hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography. *PLoS Pathog* **9**:e1003132.

-
241. **Westcott, D. G., J. P. Frossard, D. Everest, A. Dastjerdi, J. P. Duff, F. Steinbach, and B. Choudhury.** 2014. Incursion of RHDV2-like variant in Great Britain. *Vet Rec* **174**:333.
242. **White, P. J., R. A. Norman, and P. J. Hudson.** 2002. Epidemiological consequences of a pathogen having both virulent and avirulent modes of transmission: the case of rabbit haemorrhagic disease virus. *Epidemiology and Infection* **129**:665-677.
243. **Widdowson, M. A., and J. Vinje.** 2008. Food-borne viruses-state of the art., p. 29-64. *In* M. Koopmans, D. O. Cliver, and A. Bosch (ed.), *Food-borne viruses: Progress and challenges*. ASM Press., Washington, D.C.
244. **Win, S. J., V. K. Ward, P. R. Dunbar, S. L. Young, and M. A. Baird.** 2011. Cross-presentation of epitopes on virus-like particles via the MHC I receptor recycling pathway. *Immunol Cell Biol* **89**:681-8.
245. **Winkler, F. K., C. E. Schutt, S. C. Harrison, and G. Bricogne.** 1977. Tomato bushy stunt virus at 5.5-Å resolution. *Nature* **265**:509-13.
246. **Wirblich, C., H. J. Thiel, and G. Meyers.** 1996. Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies. *J Virol* **70**:7974-83.
247. **Wobus, C. E., L. B. Thackray, and H. W. t. Virgin.** 2006. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol* **80**:5104-12.
248. **Wolf, S., J. Reetz, K. Hoffmann, A. Grundel, B. A. Schwarz, I. Hanel, and P. H. Otto.** 2012. Discovery and genetic characterization of novel caliciviruses in German and Dutch poultry. *Arch Virol* **157**:1499-507.
249. **Wolf, S., J. Reetz, and P. Otto.** 2011. Genetic characterization of a novel calicivirus from a chicken. *Arch Virol* **156**:1143-50.
250. **Yildiz, I., S. Shukla, and N. F. Steinmetz.** 2011. Applications of viral nanoparticles in medicine. *Curr Opin Biotechnol* **22**:901-8.
251. **Yin, Y., Y. Tohya, Y. Ogawa, D. Numazawa, K. Kato, and H. Akashi.** 2006. Genetic analysis of calicivirus genomes detected in intestinal contents of piglets in Japan. *Arch Virol* **151**:1749-59.
252. **Young, S. L., M. Wilson, S. Wilson, K. W. Beagley, V. Ward, and M. A. Baird.** 2006. Transcutaneous vaccination with virus-like particles. *Vaccine* **24**:5406-12.
253. **Zambon, M.** 2014. Developments in the treatment of severe influenza: lessons from the pandemic of 2009 and new prospects for therapy. *Curr Opin Infect Dis* **27**:560-5.
254. **Zebedee, S. L., C. D. Richardson, and R. A. Lamb.** 1985. Characterization of the influenza virus M2 integral membrane protein and expression at the infected-cell surface from cloned cDNA. *J Virol* **56**:502-11.
255. **Zeltins, A.** 2013. Construction and characterization of virus-like particles: a review. *Mol Biotechnol* **53**:92-107.
256. **Zhao, Q., S. Li, H. Yu, N. Xia, and Y. Modis.** 2013. Virus-like particle-based human vaccines: quality assessment based on structural and functional properties. *Trends Biotechnol* **31**:654-63.
257. **Zheng, D. P., T. Ando, R. L. Fankhauser, R. S. Beard, R. I. Glass, and S. S. Monroe.** 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* **346**:312-23.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Rabbit hemorrhagic disease virus capsid, a versatile platform for foreign B-cell epitope display inducing protective humoral immune responses

Noelia Moreno¹, Ignacio Mena^{1,†}, Iván Angulo¹, Yolanda Gómez¹, Elisa Crisci^{2,‡}, María Montoya^{2,3}, José R. Castón⁴, Esther Blanco¹ & Juan Bárcena¹

Virus-like particles (VLPs), comprised of viral structural proteins devoid of genetic material, are tunable nanoparticles that can be chemically or genetically engineered, to be used as platforms for multimeric display of foreign antigens. Here, we report the engineering of chimeric VLPs, derived from rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) for presentation of foreign B-cell antigens to the immune system. The RHDV capsid comprises 180 copies of a single capsid subunit (VP60). To evaluate the ability of chimeric RHDV VLPs to elicit protective humoral responses against foreign antigens, we tested two B-cell epitopes: a novel neutralizing B-cell epitope, derived from feline calicivirus capsid protein, and a well characterized B-cell epitope from the extracellular domain of influenza A virus M2 protein (M2e). We generated sets of chimeric RHDV VLPs by insertion of the foreign B-cell epitopes at three different locations within VP60 protein (which involved different levels of surface accessibility) and in different copy numbers per site. The immunogenic potential of the chimeric VLPs was analyzed in the mouse model. The results presented here indicated that chimeric RHDV VLPs elicit potent protective humoral responses against displayed foreign B-cell epitopes, demonstrated by both, *in vitro* neutralization and *in vivo* protection against a lethal challenge.

Nanobiotechnology involves the exploitation of biomaterials, devices or methodologies at the nanoscale. Virus particles constitute natural nanomaterials that are receiving increasing attention due to their potential use in diverse biomedical applications, such as cell targeting, drug delivery or vaccine development^{1–5}.

Virus-like particles (VLPs) are supramolecular assemblages with well-defined geometry that mimic the overall structure of native virions, while lacking any viral genome^{6,7}. These multimeric protein cages are based on the natural intrinsic ability of structural viral subunits to spontaneously self assemble into nanoparticles (in the range of 25–100 nm), when produced using recombinant expression systems^{8,9}. They are composed of multiple copies of one or more viral proteins and are usually antigenically indistinguishable from infectious virus or subviral particles¹⁰. Thus, VLPs exhibit properties that are highly advantageous for vaccine development, combining convenient features of whole-virus-based and recombinant subunit vaccines¹¹. By their nature, VLP-based vaccines provide a high safety profile, can stimulate both innate and adaptive immune responses, elicit protective systemic and mucosal immunity, and have been shown to exhibit self-adjuvanting abilities^{12–14}. These characteristics have made VLPs attractive stand-alone vaccine candidates for many viral diseases¹⁵. In addition, VLPs can be chemically or genetically engineered^{16–20} to be used as platforms for multimeric display of foreign antigens derived from

¹Centro de Investigación en Sanidad Animal (INIA-CISA), Valdeolmos, 28130 Madrid, Spain. ²Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain. ³The Pirbright Institute, Ash Road, Woking, Surrey, GU24 0NF, United Kingdom. ⁴Department of Structure of Macromolecules, Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. [†]Present address: Department of Microbiology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA. [‡]Present address: Division of Molecular Virology, Department of Clinical and Experimental Medicine, Linköping University, Linköping, Sweden. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.B. (email: barcena@inia.es)

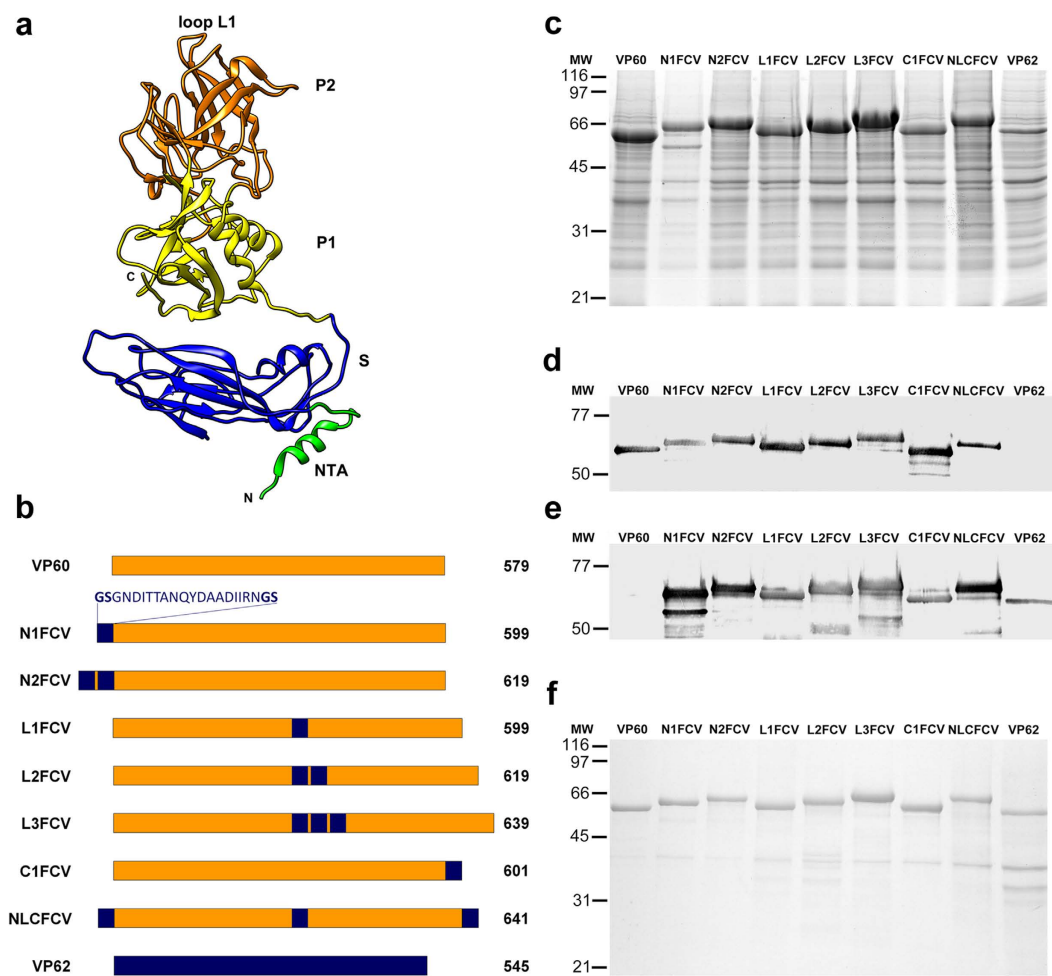


Figure 1. Expression and characterization of VP60 insertion mutants harbouring a FCV capsid protein B-cell epitope. (a) Ribbon representation of the VP60 protein structure (Protein Data Bank [PDB] accession number 3J1P). The NTA, S domain, P1 and P2 subdomains, and loop L1 are indicated. (b) Schematic representation showing names (left) and protein lengths in amino acids (right). The amino acid sequence depicted (FCV B-cell epitope) was inserted at the indicated positions in each VP60 insertion mutant. RHDV capsid protein (VP60) and FCV capsid protein (VP62) are also shown. (c) H5 cells were infected with each recombinant baculovirus and infected-cell lysates were analyzed by SDS-10% PAGE. (d,e) Western blots performed using a rabbit hyperimmune serum against RHDV to detect VP60 protein (d), or a monoclonal antibody directed against the FCV B-cell epitope (e). (f) Infected H5 cell cultures were subjected to VLP-purification procedures and the resulting samples were characterized by SDS-10% PAGE. Molecular weight markers (MW; $\times 10^3$ Da) are given on the left.

viruses or other pathogens, which, in turn, can be developed into vaccines^{21,22}. Here, we report the generation of chimeric VLPs displaying foreign B-cell antigens to the immune system, using as platform the capsid of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV).

Rabbit haemorrhagic disease (RHD) is a highly infectious and fatal disease of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) (reviewed in²³). The etiological agent, RHDV, is the prototype species of *Lagovirus* genus within the *Caliciviridae* family. It is a non-enveloped, icosahedral, single-stranded positive-sense RNA virus. The virus capsid (~40 nm diameter) comprises 180 copies (90 dimers) of a single capsid subunit, the VP60 protein (also termed VP1), arranged with T = 3 symmetry to form 12 pentamers and 20 hexamers. RHDV, as most caliciviruses, cannot be grown in cell culture and much of our understanding of these viruses relies on studies performed with recombinant VLPs that are morphologically and antigenically identical to infectious RHDV virions²⁴. RHDV VLPs have been shown to induce full protection of rabbits against a lethal challenge with RHDV and are used as diagnostic reagents^{24,25}.

The VP60 protein has three domains²⁶ (Fig. 1a), an N-terminal arm (NTA), a shell (S) forming a scaffold which protects the viral RNA, and a flexible protruding domain (P) at the capsid surface, which contains determinants for virus-host receptor interactions and antigenic diversity^{25–27}. The P domain can be further divided into P1 and P2 subdomains, with P2 subdomain located at the outermost surface-exposed region of the viral capsid.

We have previously performed an exhaustive structural analysis of the RHDV capsid and have shown that the VP60 protein can accommodate insertions of foreign amino acid sequences without disrupting VLP

formation^{28,29}, raising the possibility of using RHDV VLPs as foreign epitope carriers for vaccine development. In this report we evaluated the ability of chimeric RHDV VLPs to elicit humoral responses against inserted foreign B-cell epitopes. We tested two different epitopes: a newly described neutralizing B-cell epitope derived from the feline calicivirus (FCV) capsid protein (VP62), and the well characterized and highly conserved B-cell epitope located within the extracellular domain of the influenza A virus M2 protein (M2e)³⁰. We generated sets of chimeric RHDV VLPs by inserting the foreign B-cell epitopes at different locations within the VP60 protein and in different copy numbers per site. The immunogenic potential of the different chimeric VLPs was analyzed in the mouse model. The results indicated that chimeric RHDV VLPs elicit potent protective humoral responses against foreign B-cell epitopes, demonstrated by both, *in vitro* neutralization and *in vivo* protection against a lethal challenge.

Results

Generation and characterization of RHDV chimeric VLPs displaying an FCV capsid protein-neutralizing epitope. Recombinant baculoviruses expressing different VP60 insertion mutants were generated (Fig. 1b). The foreign amino acid sequence inserted (22 aa) contained a B-cell epitope derived from the FCV capsid protein (VP62). This newly described B-cell epitope was recognized by neutralizing monoclonal antibodies obtained and characterized at our laboratory. The sequence inserted was flanked by amino acids glycine and serine (GS) as a flexible linker intended to facilitate capsid assembly.

The foreign peptide sequence was inserted at three locations within the VP60 protein and in different copy numbers per site (Fig. 1b), on the basis of previous structural analyses^{28,29}. Chimeric mutants were generated by inserting one or two copies of the B-cell epitope between amino acid positions 2 and 3 of VP60 protein sequence (N1FCV and N2FCV, respectively). According to the atomic structure of RHDV capsid²⁶, the N-terminus of VP60 protein is facing the inner core of the viral capsid. Another set of chimeric mutants was produced by inserting 1–3 copies of the B-cell epitope between amino acid positions 306 and 307 of VP60 protein (L1FCV, L2FCV and L3FCV, respectively). This insertion site is located within loop L1 at the tip of the P2 subdomain of VP60 protein, the most surface-exposed region of the viral capsid^{26,29}. An additional chimeric mutant was generated harbouring one copy of the B-cell epitope at the C-terminal end of VP60 protein (C1FCV), which faces the outer surface of the viral capsid at the pentameric and hexameric cup-shaped depressions^{26,29}. We completed the set of mutants generating a construct (NLCFCV) bearing one copy of the B-cell epitope in each of the three insertion sites identified within VP60 protein. Finally, along with the RHDV-derived VP60 chimeric mutants, we produced a recombinant baculovirus expressing the native FCV capsid protein (VP62), to enable comparison of the immunogenicity induced by the foreign epitope incorporated to the RHDV chimeric VLPs, with that elicited by the same epitope in its natural context.

Expression of the recombinant constructs in H5 insect cell cultures infected with the corresponding recombinant baculoviruses was analysed by SDS-10% PAGE. As shown in Fig. 1c, extracts from cells infected with the recombinant baculovirus harbouring the RHDV VP60 native protein, exhibited a major protein band with an apparent molecular weight of ≈ 60 kDa, which was not present in wild-type baculovirus-infected cells (data not shown). Expression levels of the VP60 insertion mutants were grossly similar to those of VP60 native protein, and the corresponding bands were detected with mobilities according to the length of the foreign peptide sequences incorporated in each construct. The FCV VP62 native protein was detected with its expected mobility (≈ 59.4 kDa), exhibiting lower expression levels than the VP60-derived constructs. A rabbit hyperimmune serum against RHDV specifically detected baculovirus-expressed VP60 protein as well as the VP60 chimeric insertion mutants, but did not react with FCV VP62 protein in Western blot (Fig. 1d). A monoclonal antibody directed against the FCV-derived B-cell epitope reacted both, with native VP62 protein and with the VP60 chimeric constructs, but did not react with native VP60 protein (Fig. 1e).

To determine whether the recombinant constructs generated were able to assemble into particulate material, infected H5 cell cultures were subjected to VLP-purification procedures and the resulting samples were characterized by SDS-10% PAGE (Fig. 1f) and electron microscopy (Fig. 2). Negatively stained samples corresponding to all the chimeric constructs generated harbouring the FCV-derived epitope (RHDV-FCV VLPs), assembled as VLPs of approximately 40 nm in diameter, which were morphologically similar to the VLPs formed by wild-type VP60 and VP62 proteins.

Humoral immune responses to chimeric RHDV-FCV VLPs. Groups of five C57BL/6 mice were immunized twice intraperitoneally with 100 μ g of each purified VLP emulsified in Montanide adjuvant. Blood samples were collected 14 days after boost and the sera obtained were tested for antibodies against VP60 protein (RHDV VLPs) (Fig. 3a) and the FCV-derived B-cell epitope (a synthetic peptide) (Fig. 3b). Serum IgG antibody titers were measured by ELISA, and geometric mean titers (GMTs) were calculated for each group of mice. All preimmune serum samples were negative (titer < 50) for IgGs against both antigens tested (data not shown). Control mice only receiving PBS with adjuvant also lacked specific serum IgG (titer < 50 data not shown). As expected, all mice immunized with RHDV or chimeric RHDV VLPs developed high titers of VP60-specific antibodies (GMTs ranging from 1.37×10^6 to 10.75×10^6 ; Fig. 3a). However, anti-VP60 responses induced by chimeric VLPs with insertions at loop L1 (L1FCV, L2FCV, L3FCV and NLCFCV) were significantly lower ($P < 0.001$) than those induced by native RHDV VLPs (VP60). As shown in Fig. 3b, all mice immunized with either chimeric RHDV VLPs or FCV VLPs (VP62) developed anti-FCV specific antibodies, whereas sera from mice immunized with native RHDV VLPs were negative (titer < 50). Insertion site of the foreign B-cell epitope was shown to influence the anti-FCV antibody titers induced by the chimeric VLPs (Fig. 3b, compare hatched bars). Mice inoculated with L1FCV exhibited significantly higher titers (GMT = 4.04×10^5), as well as lower dispersion in antibody titers within the group (lower standard error of the mean), than mice inoculated with N1FCV (GMT = 6.94×10^4 ; $P < 0.05$) or mice inoculated with C1FCV (GMT = 3.22×10^3 ; $P < 0.001$). Interestingly, the GMT of group L1FCV

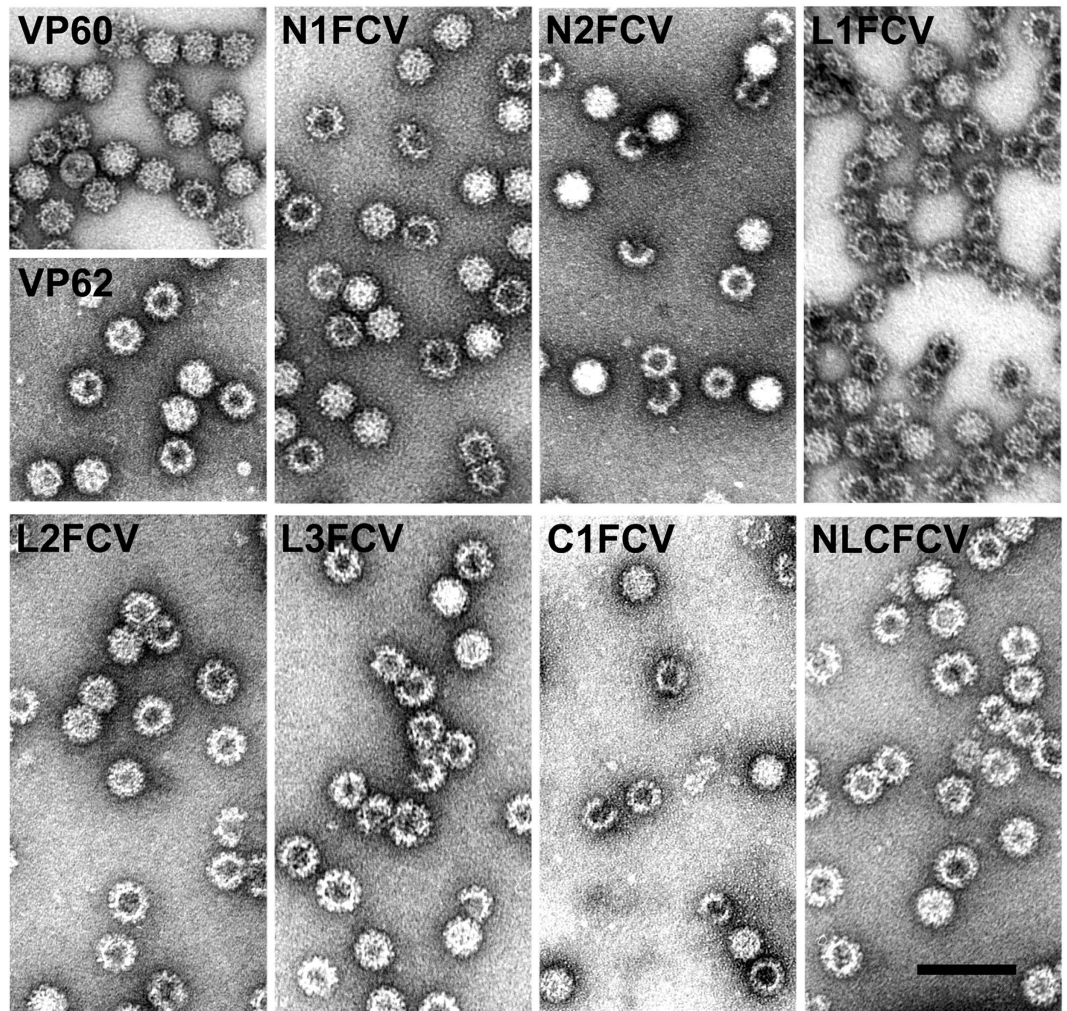


Figure 2. Analysis of VP60-related virus-like particles by electron microscopy. Negatively stained purified particles corresponding to RHDV VP60 and FCV VP62 (top, left), and the indicated VP60 chimeric mutants were analyzed by electron microscopy. Scale bar = 100 nm.

was three-fold higher than that corresponding to the group of mice inoculated with native VP62 FCV VLPs ($\text{GMT} = 1.32 \times 10^5$), although this difference was not statistically significant. The results also revealed that increasing the FCV epitope copy number per VLP resulted in a significant increase in the anti-FCV specific antibody titers elicited (Fig. 3b, compare GMTs of N1FCV with N2FCV, and GMTs of L1FCV with L2FCV, L3FCV and NLCFCV). It is interesting to note that construct N2FCV, incorporating two copies of the foreign epitope per VP60 monomer (360 copies per VLP), induced specific antibody titers ($\text{GMT} = 4.91 \times 10^5$) which were seven-fold higher than those corresponding to N1FCV, displaying half the number of copies of the foreign epitope (180 copies per VLP). Likewise, construct L3FCV (540 copies per VLP) induced specific antibody titers ($\text{GMT} = 2.06 \times 10^6$) five-fold higher than those elicited by L1FCV (180 copies per VLP). This suggested that the increased specific immunogenicity observed with both chimeric constructs harbouring tandem repeats of the foreign epitope, was not merely attributable to a concomitant increase in the amount of epitopes delivered, but was rather a result of a synergistic effect of tandem repeats over the immune response elicited. However, this was not always the case. Constructs L2FCV ($\text{GMT} = 7.25 \times 10^5$) and NLCFCV ($\text{GMT} = 1.36 \times 10^6$) induced specific antibody titers that were approximately two-fold and three-fold those induced by L1FCV, respectively. Thus, a synergistic effect was not evident in those instances. Overall, the highest titers of antibodies against the FCV foreign epitope were induced by chimeric construct L3FCV, which elicited a GMT that was over fifteen-fold higher than that induced by native VP62 FCV VLPs.

Neutralizing antibody responses induced by chimeric RHDV-FCV VLPs. Sera samples were analyzed by a plaque-reduction neutralization assay (Fig. 3c). Negative control sera (data not shown), as well as sera from the group of mice inoculated with native VP60 RHDV VLPs, failed to induce any detectable neutralizing activity. All mice immunized with chimeric RHDV VLPs exhibited significant levels of anti-FCV neutralizing activity, albeit to different extents (ranging from 18.64% to 98.45% of plaque reduction). These results demonstrated the ability of the FCV B-cell epitope reported in this work to elicit efficient neutralizing antibodies against FCV infection, although a complete neutralizing activity (100% plaque-reduction) was not achieved

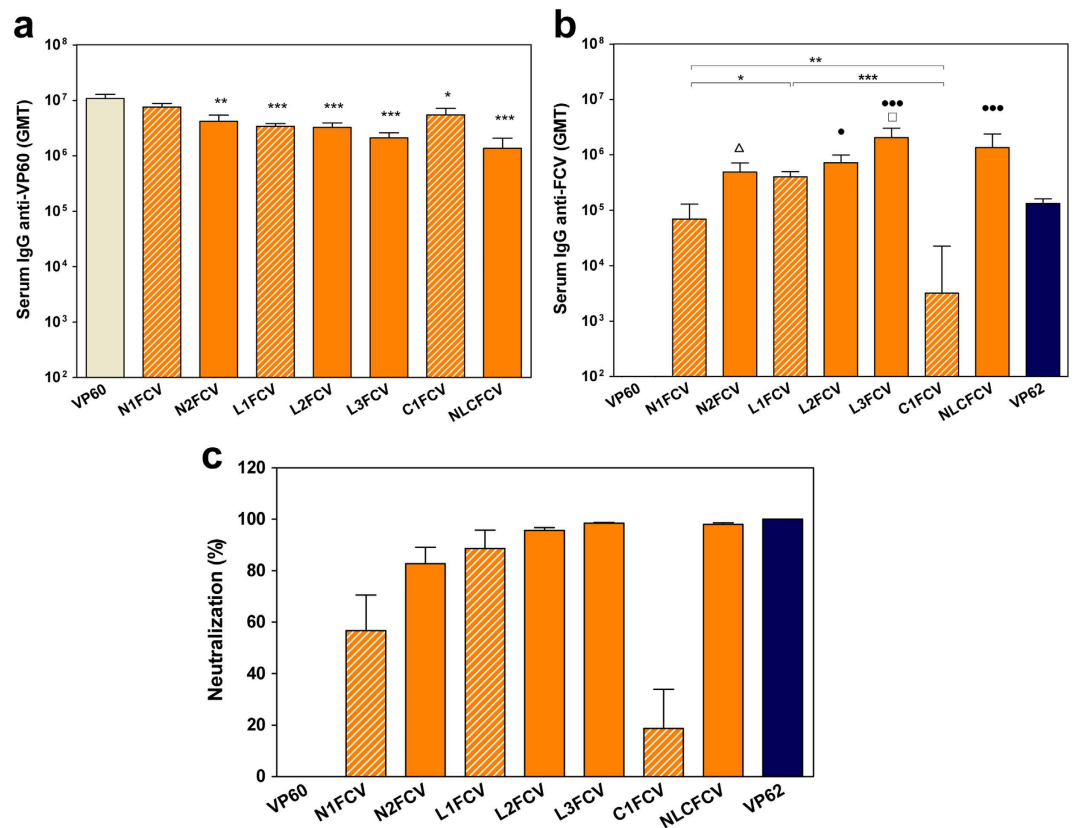


Figure 3. Humoral responses induced in mice by immunization with chimeric RHDV-FCV VLPs. Sera samples from groups of mice inoculated twice with the indicated VLPs were analyzed by ELISA (a,b), or a plaque-reduction neutralization assay specific for FCV virus (c). Serum IgG antibody titers were measured by ELISA using RHDV VLPs to detect anti-VP60 antibodies (a), or a synthetic peptide encompassing FCV B-cell epitope sequence, to detect anti-FCV antibodies (b). The GMT was calculated for each group of mice. Error bars show the standard error of the mean. The groups corresponding to chimeric VLPs harbouring one copy of the inserted epitope per VP60 monomer (N1FCV, L1FCV and C1FCV) are shown as hatched bars. In (a), statistically significant differences in anti-VP60 antibody titers, with respect to those corresponding to the VP60 group are shown as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. In (b), statistically significant differences in anti-FCV antibody titers between groups N1FCV, L1FCV and C1FCV (hatched bars) are shown as *; differences between groups harbouring the inserted epitope at the N-terminus are shown as Δ ; differences between groups harbouring the inserted epitope at loop L1 are shown as \square ; and differences with respect to the antibody titers corresponding to the FCV VP62 group are shown as \bullet .

under the assay conditions used (sera samples diluted 1/20). In contrast, sera samples from mice immunized with native VP62 FCV VLPs exhibited 100% neutralizing activity (even when assayed at 1/80 dilution). This probably reflected the ability of FCV VLPs to induce a polyclonal neutralizing antibody response, with the concurrent involvement of several neutralizing epitopes present at the FCV capsid³¹, while chimeric RHDV VLPs were only displaying a single FCV B-cell epitope. Results presented here on the magnitude of the anti-FCV neutralizing response, regarding foreign-epitope insertion site and epitope copy numbers per VLP monomer, closely resembled those indicated above (compare Fig. 3b,c). Thus, the chimeric construct L1FCV elicited higher neutralizing activity than N1FCV and C1FCV, and increasing epitope copy numbers resulted in an enhancement of specific anti-FCV neutralizing activity.

Generation and characterization of RHDV chimeric VLPs displaying influenza A virus M2e. The promising results obtained led us to further explore the feasibility of using RHDV VLPs as a vaccine delivery system, by analyzing their ability to induce protective immunity against a viral challenge in an animal model. Therefore, we decided to use a well characterized B-cell epitope, the ectodomain of influenza A virus M2 protein (M2e), which is able to render protection against a lethal challenge in mice, if correctly delivered to the immune system³⁰. Following the same approach described above, we generated a new set of recombinant baculoviruses expressing VP60 insertion mutants (Fig. 4a). The foreign amino acid sequence was incorporated at the three previously described insertion sites within the VP60 protein, generating the chimeric VP60-M2 constructs: NM2, LM2 and CM2. Infection of H5 insect cell cultures with the corresponding recombinant baculoviruses, resulted in efficient expression of the VP60-M2 proteins (Fig. 4b). Western blot analysis revealed that chimeric constructs were detected by both, a rabbit hyperimmune serum against RHDV (Fig. 4c) and a monoclonal antibody specific

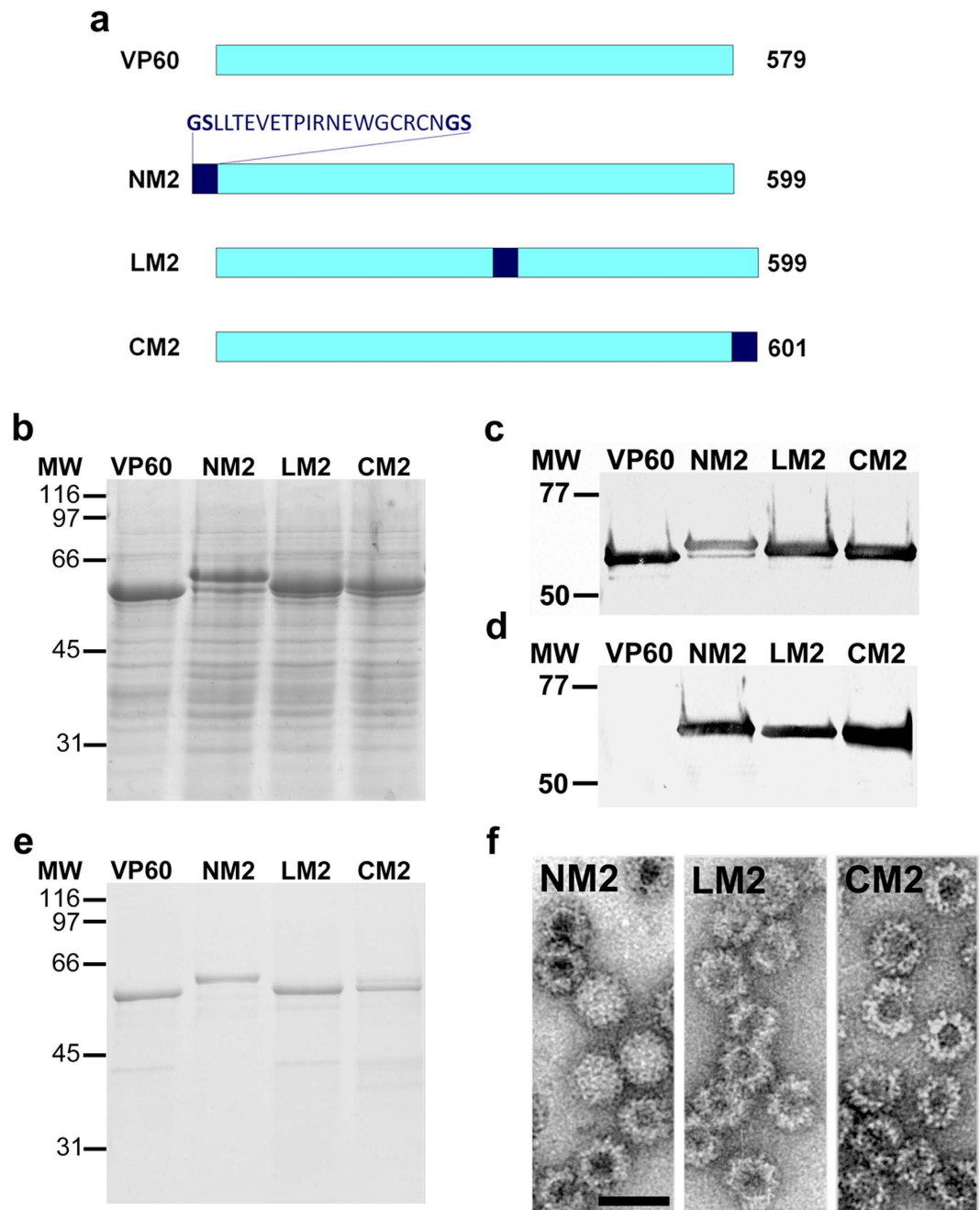


Figure 4. Expression and characterization of VP60 insertion mutants harbouring influenza A virus M2e. (a) The scheme shows names (left) and protein lengths in amino acids (right). The amino acid sequence depicted (M2e epitope) was inserted at the indicated positions in each VP60 insertion mutant. (b) SDS-10% PAGE analysis of H5 cell-lysates infected with recombinant baculoviruses expressing the indicated VP60 insertion mutants. (c,d) Western blots, performed using a rabbit hyperimmune serum against RHDV to detect VP60 protein (c), or a monoclonal antibody directed against M2e (d). (e) SDS-10% PAGE analysis of purified VLP preparations. Molecular weight markers (MW; $\times 10^3$ Da) are given on the left. (f) Negatively stained purified particles corresponding to the indicated VP60 chimeric mutants analyzed by electron microscopy. Scale bar = 100 nm.

for M2e (Fig. 4d). Finally, infected H5 cell cultures were subjected to VLP-purification procedures and the resulting samples (Fig. 4e) were characterized by negative-staining electron microscopy, confirming that the three chimeric constructs assembled into VLPs of approximately 40 nm in diameter (RHDV-M2 VLPs) (Fig. 4f).

Humoral immune responses to chimeric RHDV-M2 VLPs. Groups of five BALB/c mice were immunized twice intraperitoneally with 100 μ g of each purified VLP emulsified in Montanide adjuvant. Blood samples were collected 14 days after boost and sera were tested for antibodies against VP60 protein (RHDV VLPs)

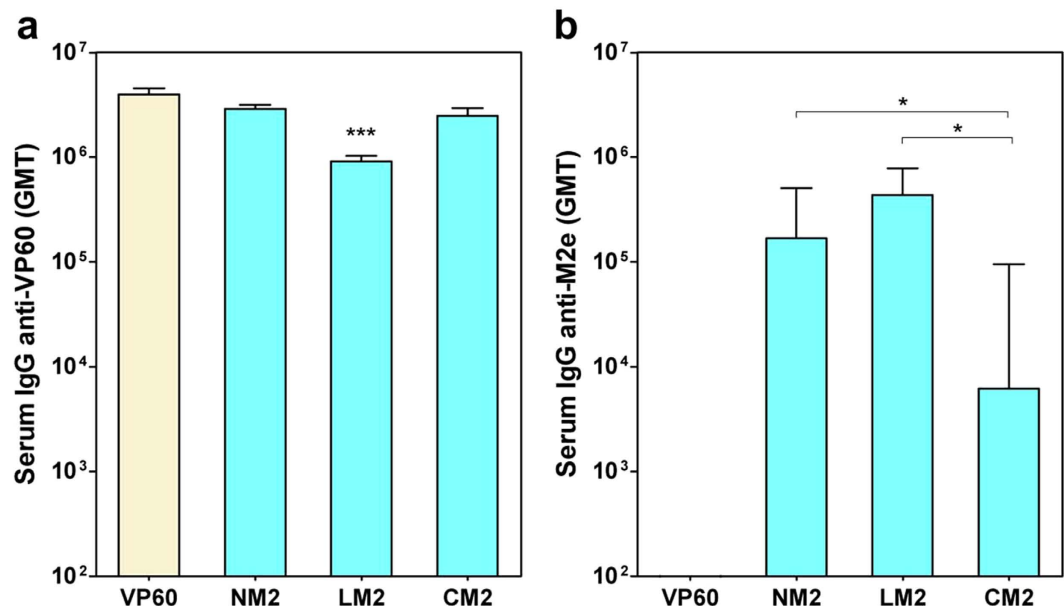


Figure 5. Humoral responses induced in mice by immunization with chimeric RHDV-M2 VLPs. Sera samples from groups of mice inoculated twice with the indicated VLPs were analyzed by ELISA. Serum IgG antibody titers were measured using RHDV VLPs to detect anti-VP60 antibodies (a), or a synthetic peptide encompassing the M2e sequence (b). The GMT was calculated for each group of mice. Error bars show the standard error of the mean. In (a), statistically significant differences in anti-VP60 antibody titers, with respect to that corresponding to the VP60 group are shown as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. In (b), statistically significant differences in anti-M2e antibody titers between groups are shown as*.

(Fig. 5a) and M2e (a synthetic peptide) (Fig. 5b). Serum IgG antibody titers were measured by ELISA, and the GMT was calculated for each group of mice. All preimmune serum samples were negative (titer < 50) for IgGs against both antigens tested (data not shown). Control mice only receiving PBS with adjuvant also lacked specific serum IgG (titer < 50; data not shown). All mice immunized with RHDV or chimeric RHDV VLPs developed high titers of VP60-specific antibodies (GMTs ranging from 8.73×10^5 to 3.83×10^6). As previously shown with RHDV-FCV VLPs, the chimeric construct harbouring the foreign epitope at loop L1 of VP60 protein (LM2), elicited significantly lower VP60-specific antibody titers ($P < 0.001$) than native RHDV VLPs. All mice immunized with RHDV-M2 VLPs developed anti-M2e specific antibodies, whereas mice immunized with native RHDV VLPs (VP60) were negative (titer < 50). (Fig. 5b). Resembling the results described above for RHDV-FCV VLPs, the group of mice inoculated with chimeric construct LM2 (GMT = 4.36×10^5) exhibited a higher GMT than that corresponding to group NM2 (GMT = 1.69×10^5 ; although the difference was not statistically significant), and group CM2 (GMT = 6.15×10^3 ; $P < 0.05$).

Protection induced by RHDV-M2 VLPs against a lethal influenza virus challenge. Subsequently, we evaluated the protective efficacy of the RHDV-M2 VLPs in mice using a mouse-adapted influenza (PR8) challenge model. Groups of nine BALB/c mice were immunized twice by the subcutaneous route with 100 μ g of each purified VLP emulsified in Montanide adjuvant. Mice were then challenged intranasally with a lethal dose (500 PFU/mouse) of influenza virus. One mouse from each group: LM2 and CM2, died before challenge. Body weight changes and survival rates were monitored for 14 days after virus challenge (Fig. 6). Mice belonging to the negative control group (PBS) and the group inoculated with native RHDV VLPs (VP60) showed a severe body weight loss from day 3 (Fig. 6a) and 100% succumbed to the influenza virus lethal challenge between days 5 and 7 (Fig. 6b). Mice immunized with NM2 and CM2 chimeric VLPs exhibited similar trends of morbidity and mortality. The mean body weight of both groups progressively decreased until day 7 post challenge, reaching average body weight losses of 24.97% (NM2) and 24.99% (CM2), and then gradually recovered to normal values. Between days 6 and 7 post challenge, 4 out of 9 mice from group NM2 and 4 out of 8 mice from group CM2, died (survival rates of 55.5% and 50%, respectively). In contrast, the group of mice immunized with LM2 chimeric VLPs exhibited a less drastic mean body weight loss (up to 17.84% by day 7), and mice rapidly recovered normal weight values, indicating mild disease. Only 1 out of 8 mice from this group died (survival rate 87.5%). Differences in body weight change and survival rates between the group of mice immunized with LM2 chimeric VLPs and the control groups (PBS and VP60) were statistically significant ($P < 0.01$). Taken together, LM2 chimeric VLPs successfully protected mice from a lethal challenge with influenza virus.

Serum IgG titers against M2e induced by RHDV-M2 VLPs correlate with protection against influenza virus challenge. Sera samples obtained just before challenge were tested by ELISA for antibodies against M2e (synthetic peptide) and GMTs were calculated for each group of mice (Fig. 7). Results

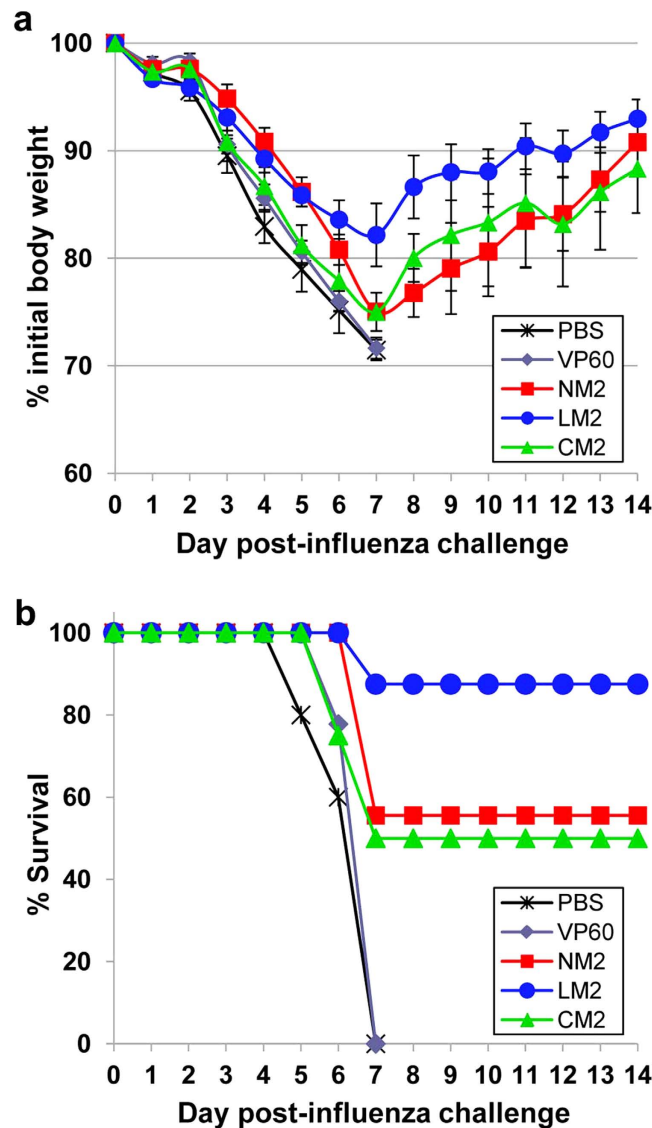


Figure 6. Protection against lethal challenge. Groups of mice immunized twice with the indicated VLPs (or PBS) were challenged intranasally with a lethal dose of influenza virus A/PR/8/34 (5 LD₅₀). **(a)** Morbidity was assessed by daily monitoring body weight for two weeks. Values represent the mean weight of each group expressed as a percentage of the initial weight on the day of inoculation (100%). Error bars show the standard error of the mean. **(b)** Survival was monitored for 14 days and is expressed as the percentage of surviving mice.

obtained resembled those shown above (Fig. 5b), indicating that RHDV-M2 VLPs elicited similar immune responses in mice upon intraperitoneal (Fig. 5b), or subcutaneous (Fig. 7) administration. All mice immunized with RHDV-M2 VLPs developed anti-M2e specific antibodies (Fig. 7) whereas negative control mice (PBS) and mice immunized with native RHDV VLPs (VP60) were negative (titer < 50) (data not shown). Again, the highest GMT of IgGs against M2e corresponded to the group of mice inoculated with chimeric construct LM2 (GMT = 6.37×10^4), which was higher than that corresponding to groups NM2 (GMT = 3.78×10^4) and CM2 (GMT = 1.92×10^4). Interestingly, the results demonstrated a clear correlation between the anti-M2e IgG titers elicited by chimeric RHDV-M2 VLPs in mice and the level of protection afforded against lethal influenza virus challenge (Fig. 7). Thus, all mice eliciting anti-M2e IgG titers $\geq 39,985$, survived lethal challenge, while mice that developed anti-M2e IgG titers $\leq 30,161$, succumbed to the influenza virus infection (except one mice from group NM2 which survived, having an anti-M2e IgG titer of 25,812). In light of these results, a set point of specific IgG titer against M2e of $\geq 39,985$ could be considered a correlate of protection in this system. Additionally, this result provided an explanation for the marked differences observed in morbidity and survival rates, between the group of mice inoculated with LM2 and the groups of mice inoculated with NM2 and CM2. As shown in Fig. 7, immunization with LM2 promoted a more consistent and homogeneous humoral immune response, with 7 out of 8 mice (as well as the GMT of the group) exhibiting anti-M2e antibody titers above the observed threshold level associated with protection. In contrast, immunization with NM2 and CM2 promoted more heterogeneous responses, with around 50% of mice (as well as the GMTs of the groups) exhibiting anti-M2e antibody titers below the threshold level associated with protection.

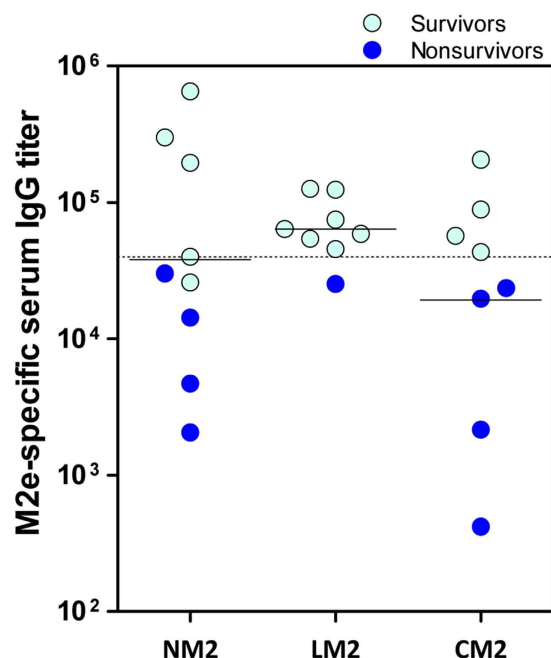


Figure 7. Serum IgG titers against M2e induced by RHDV-M2 VLPs correlate with protection against influenza A virus challenge. Sera samples obtained from the indicated groups of mice, just before the lethal challenge, were tested by ELISA for antibodies against M2e. Values represent the antibody titer of each individual mouse. The GMT was calculated for each group (solid lines). The dashed line depicts the antibody titer value of 39,000. All mice that elicited anti-M2e IgG titers above this threshold value survived the influenza virus lethal challenge.

Discussion

Currently, there is a clear trend towards the establishment of VLPs as a powerful tool for vaccine development^{32,33}. VLP-based vaccines have already been licensed for human diseases as well as for use in the veterinary field, and many more vaccine candidates are currently in late stages of evaluation^{34–36}.

Our previous studies showed that RHDV VLPs are easily produced to high yields, are highly immunogenic and can be used as diagnostic reagents or vaccines for the control of RHDV in rabbits^{25,28,37,38}. In addition, we have shown that RHDV VLPs are good platforms for inducing immune responses against inserted heterologous cytotoxic CD8+ T-cell epitopes and CD4+ T-helper epitopes, in mice and pigs^{39,40}. Other studies have addressed the potential of RHDV VLPs as a platform for delivery of tumor-associated antigens, demonstrating their ability to elicit protective cellular immunity against tumors⁴¹. RHD VLPs are efficiently uptaken by dendritic cells^{39,42,43}, which cross-present foreign T-cell epitopes via the MHC I pathway to initiate cytotoxic T-cell responses^{40,41,43}.

In this study, we further extended the potential of RHDV VLPs as an excellent novel vaccine platform, demonstrating their ability to elicit potent protective humoral responses against inserted foreign B-cell epitopes. We have shown (i) that foreign B-cell epitopes can be incorporated at least at three different insertion sites, even simultaneously, without affecting the ability of RHDV VP60 to self assemble into VLPs, (ii) that RHDV VLPs tolerate the insertion of up to at least three tandem copies of a foreign epitope (62 amino acids) at a surface-exposed insertion site, two tandem copies (42 amino acids) at the N-terminal end of the capsid protein or one copy (22 amino acids) at the C-terminal end, (iii) that chimeric RHDV VLPs elicit potent protective humoral responses against inserted foreign B-cell epitopes, demonstrated by both, *in vitro* neutralization and *in vivo* protection against a lethal challenge.

The primary goal of this study was to develop chimeric RHDV VLPs eliciting humoral immune responses to foreign B-cell epitopes. A potential problem we faced was the reported high immunogenicity of native RHDV VLPs^{24,37}, which might be detrimental, as the high level immune responses elicited by immunodominant regions of RHDV capsid could mask any specific responses directed to the incorporated foreign epitopes. With this in mind, in an attempt to increase the chances of success, we decided to evaluate different insertion sites, as well as preparing chimeric VLPs harbouring different copy numbers of the foreign B-cell epitope.

To perform this task two B-cell epitopes with different characteristics were selected. The first one was a newly described B-cell epitope derived from the capsid protein of FCV. The epitope is located at loop B'C' within P2 subdomain of VP62 protein encompassing amino acid residues 440–459. It lies within one of the two hypervariable regions (HVR) identified in VP62 protein, the N-terminal HVR (aa: 426–460), which has been reported to be involved in FCV virus-receptor interaction⁴⁴. It was identified by epitope mapping of neutralizing monoclonal antibodies obtained in our laboratory. Thus, it was anticipated that chimeric RHDV VLPs displaying this FCV epitope should be able to elicit a neutralizing immune response against FCV. Indeed, this was the case illustrating the applicability of RHDV VLPs as a platform for production of antibodies with desired specificity, directed against small peptides of choice. The second epitope used was M2e, a model antigen which has been successfully

used by other VLP-based antigen delivery systems to protect mice against an influenza virus lethal challenge^{30,45}. It was chosen because the mechanisms by which M2e-based immunogens provide protection against influenza virus infection have been analyzed in detail^{46–48}. Antibodies raised against M2e do not induce neutralization, but rather act through antibody dependent cytotoxicity (ADCC) to limit and clear viral infection⁴⁷.

Insertion site influenced the magnitude of humoral immune responses elicited against foreign epitopes displayed by chimeric RHDV VLPs. Incorporation at loop L1, within the P2 subdomain of VP60 protein, rendered the highest specific antibody titers (higher GMTs) against both B-cell epitopes assayed, and importantly, the most consistent humoral immune responses within the immunized groups (lower dispersion of the antibody titers induced), indicative of a more solid immune response. This fact seemed to be determinant in the different survival rate exhibited by mice inoculated with LM2, with respect to mice inoculated with NM2 or CM2 (see Fig. 7).

Several factors might account for the differences observed regarding the insertion site. Clearly, incorporation of foreign epitopes at loop L1 confers the highest surface accessibility to the inserted sequence, as compared to N or C-terminal ends of VP60 protein. Another relevant factor might be the immunodominant status of the region involved. Noteworthy, insertion site at loop L1 (between amino acid residues 306 and 307) lies within variation region V1 (amino acids 301–310), one of the seven highly variable regions defined on VP60 capsid protein²⁶. In fact, V1 constitutes the most diverse region among RHDV isolates⁴⁹. It is targeted by monoclonal antibodies which discriminate between classical RHDV and novel RHDV2 viruses^{25,50}. Moreover, cell- and animal-based experiments with synthetic peptides encompassing loop L1 (amino acids 300–318) showed this region is involved in virus-host interactions and stimulates production of protective neutralizing antibodies²⁶. Thus, previous reports indicated loop L1 region plays a critical role defining RHDV antigenicity and immunogenicity. Our results further reinforced the notion of an immunodominant status for loop L1, by means of incorporating foreign epitopes at this region. It not only resulted in high levels of antibodies against the inserted heterologous sequence (Figs 3b and 5b) but it also led to a significant reduction of antibody titers against VP60 protein (Figs 3a and 5a). In addition, the fact that antibody titers induced against FCV B-cell epitope by chimeric construct L1FCV were even higher than those induced by native FCV VLPs (i.e. epitope displayed in its natural context) (Fig. 3b), further highlighted the suitability of loop L1 region as insertion site for foreign B-cell epitopes. Finally, incorporation of foreign epitopes at loop L1 should lead to presentation of such epitopes as closed loops (i.e. with a constraint configuration), whereas incorporation of epitopes at the terminal ends of the capsid protein leaves the inserted peptide with either a free N or C-terminal end, thus allowing it to adopt a less constrained configuration and higher mobility. Previous studies focused on the relationship between the three-dimensional structure of an epitope inserted at the cowpea mosaic virus (CPMV) platform and its immunogenicity⁵¹, revealed that presentation as a closed loop is probably essential for good mimicry in the case of epitopes which adopt a constrained structure in their native context, while accurate structural mimicry is not an essential requirement in the case of antigens that act as linear epitopes and can be active even in a denatured form^{52,53}.

Copy numbers of the foreign B-cell epitope per VLP monomer were shown to influence the immune responses elicited by chimeric RHDV VLPs. Increasing epitope copy numbers resulted in higher specific antibody titers (Fig. 3b) and a concomitant enhancement of the neutralizing activity elicited (Fig. 3c). The best results were obtained with constructs L3FCV and NLCFCV, both harbouring three copies of the foreign epitope per VP60 monomer, (540 copies per VLP). At least in some instances (N2FCV vs. N1FCV and L3FCV vs. L1FCV) the increased specific immunogenicity observed seemed to reflect a synergistic effect of tandem repeats over the immune response elicited. These results were in agreement with previous reports on the role of epitope repetitiveness and organization using different approaches: haptenated polymer molecules⁵⁴, soluble carrier proteins⁵⁵ or conjugated VLPs⁵⁶, all of which highlighted the importance of high local epitope densities for induction of optimal B-cell responses.

In summary, using two different B-cell epitopes we have demonstrated that the RHDV-VLP display platform is able to induce a potent specific neutralizing antibody response or a protective immune response against a lethal virus challenge. Remarkably, RHDV VLPs were shown to be very tolerant not only in accepting foreign sequences at different insertion sites but also by incorporating them as several tandem repeats. The availability of at least three insertion sites per VLP monomer together with the tolerance to incorporate rather large heterologous sequences provides opportunities for versatile vaccine designs. The same antigen can be inserted at different sites and/or incorporated in tandem repeats, as was done in this study, to increase the desired specific immune response. Alternatively, different antigens could be incorporated to the RHDV VLPs, resulting in a multivalent vaccine. Interestingly, since our previous work had shown that in order to induce cellular immune responses against foreign T-cell epitopes, incorporation at the N-terminal end of VP60 protein was the best choice³⁹, our overall results open the possibility of incorporating simultaneously foreign B and T cell epitopes, at loop L1 and the N-terminus of VP60 protein, respectively. The combination of different types of epitopes (B, CD4+, and CD8+) incorporated at different sites of RHDV VLPs, paves the way for developing highly efficient multimeric vaccines, able to stimulate the different branches of the immune system.

It has been shown that pre-existing antibody responses against VLPs may exert detrimental effects on the efficacy of chimeric VLP-based vaccines⁵⁷. This is a potential problem faced by VLP vaccine platforms derived from viruses which are highly prevalent among humans or relevant livestock species^{57,58}. Since RHDV has a narrow host-range restricted to rabbits²³, no pre-existing immunity against RHDV capsid is expected in other species, thus avoiding the problem for the first use of the RHDV VLP-based platform. However, pre-existing immunity might adversely affect further uses of this VLP platform for different indications. Additional studies are required to clarify this issue. At this respect, it is assumed that no single VLP platform will be able to meet all vaccination needs⁵⁹. Therefore, the continued parallel development of multiple VLP platforms is expected to collectively allow to cover the requirements of individual vaccines. The RHDV VLP-based platform reported here represents a suitable choice of delivery system, which further extends the arsenal of VLPs available for new vaccine development.

In conclusion, our results demonstrate RHDV VLPs constitute an attractive platform for wide application in new vaccine development, both in human and the veterinary field.

Methods

Virus, cells and mice. Derivatives of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) were used to obtain the recombinant baculoviruses expressing RHDV VLPs. Baculoviruses were propagated in *Trichoplusia ni* High five cells (H5) grown in monolayer cultures at 28 °C in TNM-FH medium (Sigma-Aldrich), supplemented with 5% fetal calf serum (Gibco)⁶⁰. Feline calicivirus (FCV), Urbana strain, kindly provided by K.Y. Green (NIAID, NIH, Bethesda, MD, USA), was used to generate FCV-VLPs and to perform serum neutralization tests. Influenza A virus mouse-adapted PR8 strain (A/PuertoRico8/34, H1N1), kindly provided by A. Nieto (CNB-CSIC, Madrid, Spain) was used in the murine challenge experiments.

The immune responses induced by the different chimeric VLP constructs were assessed in mice (6- to 7-week-old female) (Harlan). C57BL/6 mice were used in experiments involving RHDV-FCV VLPs and BALB/c mice were used in experiments with RHDV-M2 VLPs.

Generation of recombinant baculovirus transfer vectors. Plasmid pHAPhSubGB, containing the coding sequences of proteins VP60 and VP2, and the 3' untranslated region of RHDV (strain AST/89, GenBank accession code Z49271)³⁹ was used as starting point. To generate plasmid vectors corresponding to VP60 constructs incorporating foreign amino acid sequences we first engineered unique BamHI restriction sites by site-directed mutagenesis at: amino acid positions 2 and 3 (plasmid pHAPh2GS); positions 306 and 307 (plasmid pHAPh306GS); and immediately before the VP60 stop codon (pHAPh580GS). The next step was the insertion of the foreign sequences of interest. For this, DNA fragments were generated by annealing the corresponding synthetic phosphorylated oligonucleotides leaving BamHI compatible ends: NeuFCV22F/NeuFCV22R, encoding the 22 amino acid sequence GSGNDITTANQYDAADIIRNGS, encompassing the FCV neutralizing B-cell epitope used in this study, and oligonucleotides sM2F/sM2R, encoding the 22 amino acid sequence GSLTEVETPIRNEWGCRCNGS, encompassing M2e. The annealed primers were subsequently ligated into the corresponding plasmids (pHAPh2GS, pHAPh306GS and pHAPh580GS) previously linearized by BamHI digestion and dephosphorylated. After ligation and transformation, bacterial colonies were analyzed by PCR to identify plasmids containing one, two or three tandem inserts in the correct orientation. All the inserted sequences in the resulting recombinant plasmids were verified by sequence analyses.

Generation of recombinant baculoviruses. All recombinant baculoviruses were generated using the flashBACULTRA expression system (Oxford Expression Technologies) following the manufacturer's instructions.

Expression and purification of recombinant RHDV VLPs. H5 cell monolayers were infected with recombinant baculoviruses at a multiplicity of infection (MOI) of 10. After incubation (4 days, 28 °C), infected cells were dislodged into the growth medium and collected. Suspensions were then washed three times with 0.2 M phosphate-buffered saline for VLPs (PBS-V, consisting of 0.2 M sodium phosphate, 0.1 M NaCl, pH 6.0). Next, pellets were resuspended in distilled water, subjected to mild sonication and treated with DNase I (Roche Applied Science) for 1 h at room temperature. Subsequently samples were adjusted to 2% Sarkosyl (sodium N-lauroylsarcosine, Sigma), 5 mM EDTA in PBS-V, and incubated overnight at 4 °C. Cell lysates were then clarified by low-speed centrifugation and the supernatant was centrifuged at 27,000 rpm for 2 h using a Beckman SW28 rotor. The pelleted material was resuspended in PBS-V, extracted 2–3 times with Vertrel XF (Fluka, Sigma-Aldrich), and centrifuged at 27,000 rpm for 2 h using a Beckman SW28 rotor. The pellets were finally resuspended in PBS-V containing protease inhibitors (Complete, Roche) and stored at 4 °C. Protein concentrations of the VLP preparations were determined with BCA protein assay kit, Pierce, Thermo Scientific.

SDS-PAGE and Western blot analyses. Samples were boiled for 5 min in protein dissociation buffer containing 5% (vol/vol) β -mercaptoethanol, 2% (wt/vol) sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% (vol/vol) glycerol, 80 mM Tris-HCl (pH 6.8), and 0.01% (wt/vol) bromophenol blue. Proteins were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and were visualized by Coomassie brilliant blue staining.

For Western blot analyses, proteins were transferred from gels onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes by standard blotting procedures. Membranes were saturated (overnight, 4 °C) with PBS–5% (wt/vol) nonfat dry milk and incubated (1 h, 37 °C) with either a rabbit hyperimmune serum against RHDV to detect VP60 protein, or monoclonal antibodies directed against the inserted foreign epitopes, as indicated. After several washes with PBS–0.05% Tween 20 (PBS-T), membranes were incubated (1 h, 37 °C) with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Pierce) or HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen). Membranes were then washed extensively with PBS-T and developed with peroxidase substrate (0.05% 4-chloro-1-naphthol, 0.08% H₂O₂ [30%], and 20% methanol in PBS).

Transmission electron microscopy. Samples (approximately 5 μ l) were applied to glow discharged carbon-coated grids for 2 min and negatively stained with 2% (wt/vol) aqueous uranyl acetate. Micrographs were recorded with a Jeol 1200 EXII electron microscope operating at 100 kV at a nominal magnification of x40,000.

Mice immunization. Groups of five mice were inoculated by the intraperitoneal route at days 0 and 21, with 100 μ g of the indicated VLP constructs emulsified in Montanide ISA 50V2 (Seppic, France), and sacrificed at day 35. A negative control group was inoculated with PBS plus adjuvant. Blood samples were collected at day 0 (before priming), day 21 (before boost) and at day 35.

Detection of specific anti-RHDV-VLP antibodies by ELISA. Polysorp 96-well ELISA plates (Nunc) were coated with purified RHDV VLPs (300 ng/well) diluted in 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6), and incubated overnight at 4 °C. Plates were blocked with PBS–5% skim milk (5% BLOTTO) for 2 h at 37 °C, washed six times with PBS-T and incubated with serial three-fold dilutions of each serum sample prepared in 5% BLOTTO, for 2 h at 37 °C. Two control samples (serial dilutions) were added to each plate: a monoclonal antibody specific against RHDV VP60 protein²⁵, and a serum sample known to lack VP60-specific antibodies. The test sera samples were analyzed in parallel in wells lacking antigen to determine background binding. After six washes with PBS-T, the plates were incubated at 37 °C for 45 min with HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen) at a 1/3,000 dilution in 5% BLOTTO. Finally, plates were extensively washed with PBS-T and colour reaction was developed with peroxidase substrate (4 mg/ml *o*-phenylenediamine and 0.08% H₂O₂ [30%] in 0.05 M phosphate-citrate buffer [pH 5.0]). Reaction was stopped by addition of 3N H₂SO₄, and colour development was recorded at 492 nm. End point titers were reported as the reciprocal of the highest dilution that had an absorbance value greater than or equal to 0.2 O.D units above background (absorbance of wells lacking antigen, which were consistently in the range of 0.035–0.055, and never exceeded 0.085).

Detection of specific anti-FCV capsid and anti-influenza M2e antibodies by ELISA. Sera samples were examined by ELISA assays using synthetic peptides as antigens: peptide GSGNDITTANQYDAADIIRN, encompassing the sequence of the FCV B-cell epitope (Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain) and peptide MSLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD comprising the M2e 24 amino acid sequence (New England Peptide). Assays were performed in 96-well high binding plates (Corning), coated with 1 µg/well of synthetic peptide diluted in PBS buffer overnight at 4 °C. The protocol was completed as described above for RHDV-specific antibody ELISAs, except that reactions were developed with 4% 3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine (TMB) peroxidase liquid substrate containing 0.02% H₂O₂ [30%]. Reactions were stopped by addition of 1,8 N H₂SO₄ and colour development was recorded at 450 nm.

FCV seroneutralization assay. Serum samples diluted 1/20 in EMEM were incubated with 150–200 PFU of FCV (Urbana strain), for 1 h at 37 °C in a final volume of 200 µl (M96 plates). Similar samples were prepared in the absence of serum as controls. Subsequently, the samples (triplicates of each serum) were added to monolayers of feline CRFK cells and incubated for 1 h 30 min at 37 °C in a total volume of 0.8 ml (M6 plates). The inocula were removed and plaque assays were performed under an overlay of 1.0% low-melting-point agarose in complete EMEM⁶¹, until visible plaques appeared (1–2 days) upon staining with crystal violet. Percent of plaque reduction was calculated by comparing the number of viral plaques present in each sample relative to the amount of viral plaques formed in the absence of serum (means of triplicates).

Influenza virus challenge experiments. Groups of 9 mice were inoculated by the subcutaneous route at days 0 and 21, with 100 µg of the indicated VLP construct emulsified in Montanide ISA 50V2 (Seppic, France). An additional group was inoculated with PBS plus adjuvant. Blood samples were collected at days 0 (before priming), 21 (before boost) and 35 (before challenge). At day 35, mice were challenged intranasally with a 5 LD₅₀ dose (500 PFU/mouse) of mouse-adapted influenza virus PR8. Morbidity was assessed by daily monitoring body weight for two weeks. At day 49, surviving mice were humanely sacrificed.

Data and statistical analysis. Values were reported as geometric mean titers (GMT) ± standard error of the mean. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Antibody titers were compared among groups of mice using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's or Dunnett's post-hoc comparison tests. Statistical significance for Kaplan-Meier survival curves was calculated with a log-rank (Mantel-Cox) test. All *p* values are two sided and *p* ≤ 0.05 were considered significant. In figures, *p* value criteria are assigned as **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

Ethics statement. Mice were maintained at the CISA-INIA animal facilities according to European Union and national guidelines for animal experimentation. The study received prior approval from the Ethical Committee for Animal Experimentation (CEEA 2013/009) and Biosecurity Committee of INIA (CBS 2013/006). All experimental procedures were conducted in accordance with protocols approved by animal welfare authorities, with the reference PROEX 47/13.

References

1. Yildiz, I., Shukla, S. & Steinmetz, N. F. Applications of viral nanoparticles in medicine. *Curr Opin Biotechnol* **22**, 901–908 (2011).
2. Schwarz, B. & Douglas, T. Development of virus-like particles for diagnostic and prophylactic biomedical applications. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **7**, 722–735 (2015).
3. Steinmetz, N. F. & Manchester, M. *Viral Nanoparticles - tools for materials science and biomedicine*. (Pan Stanford Publishing, 2011).
4. Koudelka, K. J., Pitek, A. S., Manchester, M. & Steinmetz, N. F. Virus-Based Nanoparticles as Versatile Nanomachines. *Annu Rev Virol* **2**, 379–401 (2015).
5. Smith, D. M., Simon, J. K. & Baker, J. R., Jr. Applications of nanotechnology for immunology. *Nat Rev Immunol* **13**, 592–605 (2013).
6. Johnson, J. E. & Chiu, W. Structures of virus and virus-like particles. *Curr Opin Struct Biol* **10**, 229–235 (2000).
7. Mateu, M. G. Assembly, stability and dynamics of virus capsids. *Arch Biochem Biophys* **531**, 65–79 (2013).
8. Lua, L. H. *et al.* Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnol Bioeng* **111**, 425–440 (2014).
9. Zeltins, A. Construction and characterization of virus-like particles: a review. *Mol Biotechnol* **53**, 92–107 (2013).
10. Pushko, P., Pumpens, P. & Grens, E. Development of virus-like particle technology from small highly symmetric to large complex virus-like particle structures. *Intervirology* **56**, 141–165 (2013).
11. Spohn, G. & Bachmann, M. F. Exploiting viral properties for the rational design of modern vaccines. *Expert Rev Vaccines* **7**, 43–54 (2008).
12. Bachmann, M. F. & Jennings, G. T. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat Rev Immunol* **10**, 787–796 (2010).

13. Vacher, G., Kaeser, M. D., Moser, C., Gurny, R. & Borchard, G. Recent advances in mucosal immunization using virus-like particles. *Mol Pharm* **10**, 1596–1609 (2013).
14. Jennings, G. T. & Bachmann, M. F. The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol Chem* **389**, 521–536 (2008).
15. Roldao, A., Mellado, M. C., Castilho, L. R., Carrondo, M. J. & Alves, P. M. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccines* **9**, 1149–1176 (2010).
16. Mateu, M. G. Virus engineering: functionalization and stabilization. *Protein Eng Des Sel* **24**, 53–63 (2011).
17. Brune, K. D. *et al.* Plug-and-Display: decoration of Virus-Like Particles via isopeptide bonds for modular immunization. *Sci Rep* **6**, 19234 (2016).
18. Venter, P. A. *et al.* Multivalent display of proteins on viral nanoparticles using molecular recognition and chemical ligation strategies. *Biomacromolecules* **12**, 2293–2301 (2011).
19. Walker, A., Skamel, C. & Nassal, M. SplitCore: an exceptionally versatile viral nanoparticle for native whole protein display regardless of 3D structure. *Sci Rep* **1**, 5 (2011).
20. Xu, L. *et al.* A Broadly Cross-protective Vaccine Presenting the Neighboring Epitopes within the VP1 GH Loop and VP2 EF Loop of Enterovirus 71. *Sci Rep* **5**, 12973 (2015).
21. Plummer, E. M. & Manchester, M. Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **3**, 174–196 (2011).
22. Lee, K. L., Twyman, R. M., Fiering, S. & Steinmetz, N. F. Virus-based nanoparticles as platform technologies for modern vaccines. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* (2016).
23. Abrantes, J., van der Loo, W., Le Pendu, J. & Esteves, P. J. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Vet Res* **43**, 12 (2012).
24. Laurent, S., Vautherot, J. F., Madelaine, M. F., Le Gall, G. & Rasschaert, D. Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection. *J Virol* **68**, 6794–6798 (1994).
25. Barcena, J. *et al.* Comparative analysis of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and new RHDV2 virus antigenicity, using specific virus-like particles. *Vet Res* **46**, 106 (2015).
26. Wang, X. *et al.* Atomic model of rabbit hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography. *PLoS Pathog* **9**, e1003132 (2013).
27. Leuthold, M. M., Dalton, K. P. & Hansman, G. S. Structural analysis of a rabbit hemorrhagic disease virus binding to histo-blood group antigens. *J Virol* **89**, 2378–2387 (2015).
28. Barcena, J. *et al.* The coat protein of Rabbit hemorrhagic disease virus contains a molecular switch at the N-terminal region facing the inner surface of the capsid. *Virology* **322**, 118–134 (2004).
29. Luque, D. *et al.* Epitope insertion at the N-terminal molecular switch of the rabbit hemorrhagic disease virus T = 3 capsid protein leads to larger T = 4 capsids. *J Virol* **86**, 6470–6480 (2012).
30. Neirynck, S. *et al.* A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med* **5**, 1157–1163 (1999).
31. Radford, A. D., Willoughby, K., Dawson, S., McCracken, C. & Gaskell, R. M. The capsid gene of feline calicivirus contains linear B-cell epitopes in both variable and conserved regions. *J Virol* **73**, 8496–8502 (1999).
32. Barcena, J. & Blanco, E. Design of novel vaccines based on virus-like particles or chimeric virions. *Subcell Biochem* **68**, 631–665 (2013).
33. Kushnir, N., Streatfield, S. J. & Yusibov, V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine* **31**, 58–83 (2012).
34. Zhao, Q., Li, S., Yu, H., Xia, N. & Modis, Y. Virus-like particle-based human vaccines: quality assessment based on structural and functional properties. *Trends Biotechnol* **31**, 654–663 (2013).
35. Crisci, E., Barcena, J. & Montoya, M. Virus-like particles: The new frontier of vaccines for animal viral infections. *Vet Immunol Immunopathol* **148**, 211–225 (2012).
36. Brun, A. *et al.* Current strategies for subunit and genetic viral veterinary vaccine development. *Virus Res* **157**, 1–12 (2011).
37. Perez-Filgueira, D. M. *et al.* Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV. *Virology* **364**, 422–430 (2007).
38. Lopez-Vidal, J. *et al.* Improved Production Efficiency of Virus-Like Particles by the Baculovirus Expression Vector System. *PLoS One* **10**, e0140039 (2015).
39. Crisci, E. *et al.* Chimeric calicivirus-like particles elicit protective anti-viral cytotoxic responses without adjuvant. *Virology* **387**, 303–312 (2009).
40. Crisci, E. *et al.* Chimeric calicivirus-like particles elicit specific immune responses in pigs. *Vaccine* **30**, 2427–2439 (2012).
41. Li, K. *et al.* Antigen incorporated in virus-like particles is delivered to specific dendritic cell subsets that induce an effective antitumor immune response *in vivo*. *J Immunother* **36**, 11–19 (2013).
42. Crisci, E. *et al.* *In vivo* tracking and immunological properties of pulsed porcine monocyte-derived dendritic cells. *Mol Immunol* **63**, 343–354 (2015).
43. Win, S. J., Ward, V. K., Dunbar, P. R., Young, S. L. & Baird, M. A. Cross-presentation of epitopes on virus-like particles via the MHC I receptor recycling pathway. *Immunol Cell Biol* **89**, 681–688 (2011).
44. Bhella, D. & Goodfellow, I. G. The cryo-electron microscopy structure of feline calicivirus bound to junctional adhesion molecule A at 9-angstrom resolution reveals receptor-induced flexibility and two distinct conformational changes in the capsid protein VP1. *J Virol* **85**, 11381–11390 (2011).
45. Pascual, E. *et al.* Structural basis for the development of avian virus capsids that display influenza virus proteins and induce protective immunity. *J Virol* **89**, 2563–2574 (2015).
46. El Bakkouri, K. *et al.* Universal vaccine based on ectodomain of matrix protein 2 of influenza A: Fc receptors and alveolar macrophages mediate protection. *J Immunol* **186**, 1022–1031 (2011).
47. Jegerlehner, A., Schmitz, N., Storni, T. & Bachmann, M. F. Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J Immunol* **172**, 5598–5605 (2004).
48. Deng, L., Cho, K. J., Fiers, W. & Saelens, X. M2e-Based Universal Influenza A Vaccines. *Vaccines (Basel)* **3**, 105–136 (2015).
49. Le Gall-Recule, G. *et al.* Emergence of a new lagovirus related to Rabbit Haemorrhagic Disease Virus. *Vet Res* **44**, 81 (2013).
50. Kong, D. *et al.* Production, Characterization, and Epitope Mapping of Monoclonal Antibodies Against Different Subtypes of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV). *Sci Rep* **6**, 20857 (2016).
51. Taylor, K. M. *et al.* Influence of three-dimensional structure on the immunogenicity of a peptide expressed on the surface of a plant virus. *J Mol Recognit* **13**, 71–82 (2000).
52. Dalsgaard, K. *et al.* Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nat Biotechnol* **15**, 248–252 (1997).
53. Steinmetz, N. F., Lin, T., Lomonosoff, G. P. & Johnson, J. E. Structure-based engineering of an icosahedral virus for nanomedicine and nanotechnology. *Curr Top Microbiol Immunol* **327**, 23–58 (2009).
54. Dintzis, R. Z., Vogelstein, B. & Dintzis, H. M. Specific cellular stimulation in the primary immune response: experimental test of a quantized model. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**, 884–888 (1982).
55. Liu, W. & Chen, Y. H. High epitope density in a single protein molecule significantly enhances antigenicity as well as immunogenicity: a novel strategy for modern vaccine development and a preliminary investigation about B cell discrimination of monomeric proteins. *Eur J Immunol* **35**, 505–514 (2005).

56. Jegerlehner, A. *et al.* Regulation of IgG antibody responses by epitope density and CD21-mediated costimulation. *Eur J Immunol* **32**, 3305–3314 (2002).
57. Da Silva, D. M., Pastrana, D. V., Schiller, J. T. & Kast, W. M. Effect of preexisting neutralizing antibodies on the anti-tumor immune response induced by chimeric human papillomavirus virus-like particle vaccines. *Virology* **290**, 350–360 (2001).
58. Tan, M. *et al.* Norovirus P particle, a novel platform for vaccine development and antibody production. *J Virol* **85**, 753–764 (2011).
59. Fietze, K. M., Peabody, D. S. & Chackerian, B. Engineering virus-like particles as vaccine platforms. *Curr Opin Virol* **18**, 44–49 (2016).
60. Almanza, H. *et al.* Self-assembly of the recombinant capsid protein of a swine norovirus into virus-like particles and evaluation of monoclonal antibodies cross-reactive with a human strain from genogroup II. *J Clin Microbiol* **46**, 3971–3979 (2008).
61. Barcena, J. & Blasco, R. Recombinant swinepox virus expressing beta-galactosidase: Investigation of viral host range and gene expression levels in cell culture. *Virology* **243**, 396–405 (1998).

Acknowledgements

We gratefully acknowledge support from Adolfo García-Sastre, hosting NM's PhD short-term visit to Icahn School of Medicine at Mount Sinai, (NY, USA). NM was a recipient of a PhD fellowship from Spanish Ministry of Science and Innovation (FPI grants). This work was funded by grants: AGL2013-48923-C2-1-R (to JB and MM) and BFU2014-55475R (to JRC) (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness); S2013/ABI-2906-PLATESA (to JB) and S2013/MIT-2807 (to JRC) (Comunidad Autónoma de Madrid); and BBS/E/I/00002014 (to MM) (BBSRC).

Author Contributions

I.M., E.B. and J.B. designed the study; N.M., I.M., I.A., Y.G. and J.B. generated the chimeric VLPs; J.R.C. performed the electron microscope analysis; N.M., I.M., E.C. and E.B. performed immunization experiments; N.M., I.M., M.M., E.B. and J.B. analyzed the data.; J.B. wrote the paper; I.M., I.A., E.C., J.R.C. and M.M. revised the manuscript.

Additional Information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Moreno, N. *et al.* Rabbit hemorrhagic disease virus capsid, a versatile platform for foreign B-cell epitope display inducing protective humoral immune responses. *Sci. Rep.* **6**, 31844; doi: 10.1038/srep31844 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016